

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

ACTION INOTROPE POSITIVE DE L'APÉLINE LIÉE À L'AUGMENTATION DE
L'AMPLITUDE DU COURANT SODIQUE DANS LES MYOCYTES CARDIAQUE DE
CHIEN

par

CAROLINE CHAMBERLAND

DÉPARTEMENT DE PHYSIOLOGIE ET BIOPHYSIQUE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DES SCIENCES DE LA SANTÉ
EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
MAÎTRE EN SCIENCES
EN PHYSIOLOGIE ET BIOPHYSIQUE

LE 16 AOÛT 2008



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-53384-0
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-53384-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES	ii
TABLES DES FIGURES	v
TABLE DES TABLEAUX	vi
LISTES DES ABBRÉVIATIONS	vii

RÉSUMÉ	ix
---------------	-----------

1. INTRODUCTION	1
1.1. L'apéline et son récepteur APJ-R	1
1.1.1. Découverte et caractéristiques générales	1
1.1.2. La localisation de l'apéline	4
1.1.3. La localisation du récepteur APJ-R	5
1.2. Les effets physiologiques du système apélinergique	7
1.2.1. Quelques effets généraux de l'apéline	7
1.2.2. Les effets diurétiques	8
1.2.3. Les effets vasculaires	11
1.3. Les effets cardiaques de l'apéline	15
1.4. Les mécanismes de la contraction cardiaque	19
1.5. Le courant sodique cardiaque	27
1.6. Les objectifs	33
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	36
2.1. Prélèvement du cœur de chien	36

2.2. Immunobuvardage	37
2.3. Isolation cellulaire	39
2.4. Immunofluorescence	41
2.5. Mesures électrophysiologiques	45
2.6 Statistiques	56
3. RÉSULTATS	58
3.1. Détection du récepteur APJ-R par immunobuvardage	58
3.2. Localisation du récepteur APJ-R sur les myocytes par immunofluorescence	59
3.3. Mesures du courant sodique cardiaque canin en présence d'apéline	61
4. DISCUSSION	76
4.1. Présence du récepteur APJ-R	76
4.2. Localisation du récepteur APJ-R au niveau des bandes-Z des myocytes du ventricule gauche	77
4.3. Augmentation du courant sodique en présence d'apéline	78
4.4. Augmentation du courant sodique par l'activation de la PKC	83
5. CONCLUSION	86
6. REMERCIEMENTS	88
7. BIBLIOGRAPHIE	90

8. APPENDICE 1 : Mesure du calcium intracellulaire dans les myocytes	101
cardiaques en présence d'apéline	
8.1. Matériel et Méthodes	101
8.2. Résultats	104
8.3. Aucune modification des transitoires calciques en présence d'apéline	106

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.1 : Séquences d'acides aminés des différentes formes d'apéline.	3
Figure 1.2.2 : Action centrale de l'apéline 17 (K17F).	10
Figure 1.2.3 : Effets vasculaires de l'apéline.	14
Figure 1.4.1 : Mécanisme de la contraction musculaire cardiaque impliquant les filaments de myosine et d'actine.	20
Figure 1.4.2 : Potentiel d'action cardiaque.	23
Figure 1.4.3 : Régulation du calcium intracellulaire dans une cellule cardiaque.	25
Figure 1.5.1 : Trois états de conformation du canal sodique.	29
Figure 1.5.2 : Schématisation du processus d'activation et d'inactivation du canal sodique cardiaque.	31
Figure 2.5.1 : Protocole de la capacitance de la cellule et tracé théorique de la mesure du courant capacitif en fonction du temps.	50
Figure 2.5.2 : Protocole de la courbe I/V.	51
Figure 2.5.3 : Courbe I/V théorique.	52
Figure 2.5.4 : Protocole d'inactivation.	54
Figure 2.5.5 : Protocole de la réactivation du canal.	56
Figure 3.1.1 : Présence du récepteur APJ-R au niveau d'un extrait protéique du cerveau de rat et du ventricule gauche de chien.	58
Figure 3.2.1 : Localisation du récepteur APJ-R au niveau des myocytes isolés du ventricule gauche de chien.	60
Figure 3.3.1 : Effet de l'apéline sur le courant sodique cardiaque au niveau des myocytes isolés du ventricule gauche de chien.	62

Figure 3.3.2 : Effet de l'apéline sur la relation I/V et sur la courbe d'activation du courant sodique au niveau des myocytes du ventricule gauche de chien.	63
Figure 3.3.3 : Effet de l'apéline sur la courbe d'inactivation du canal sodique au niveau des myocytes isolés du ventricule gauche de chien.	66
Figure 3.3.4 : Illustration de la fenêtre entre l'activation et l'inactivation par la juxtaposition des courbes et du courant de fenêtre I_{fNa} associé en présence d'apéline.	68
Figure 3.3.5 : Effet de l'apéline sur la courbe de réactivation du courant sodique chez les myocytes isolés du ventricule gauche de chien.	70
Figure 3.3.6 : Effets de la PKA, de la PKC et de l'apéline 13 sur la courbe I/V du courant sodique cardiaque chez les myocytes isolés du ventricule gauche de chien.	73
Figure 8.2.1 : Concentration relative de calcium intracellulaire transitoire dans les myocytes cardiaques canins en présence d'apéline 13.	105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1.1 : Distribution de l'ARNm du récepteur APJ-R et de l'apéline chez le rat, la souris et l'homme dans différents organes.	7
Tableau 2.4.1 : Dilution de Solution A pour l'acclimatation des cellules à la caféine.	43
Tableau 3.3.1 : Tableau des constantes de la réactivation.	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

ACE2 : enzyme de conversion de l'angiotensine II.

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADP : adénosine diphosphate.

APJ-R: putative angiotensin II receptor like.

APJ-R- KO : souris knock-out APJ-R.

ARNm : acide ribonucléique messenger.

ATP : adénosine triphosphate.

AV : auriculo-ventriculaire.

AVP : vasopressine.

C : capacitance.

EC₅₀ : Concentration à laquelle l'effet est de 50% de l'effet maximal (effective concentration 50%).

E_{Na} : potentiel d'inversion du sodium.

FR : fraction récupérable.

ICV : intracérébroventriculaire.

IC : insuffisance cardiaque.

I_{fNa} : courant de fenêtre sodique.

I_{Max} : courant sodique maximal.

I_{Na} : courant sodique.

IP : intrapéritonéale.

IV : intraveineux.

I/V : courant / voltage.

G_{Max} : conductance maximale du canal.

GMPc : guanosine monophosphate cyclique.

G_{Na} : conductance du canal sodique.

k : valeur de la pente de l'équation de Boltzmann.

K17F : apéline 17.

NCX : échangeur sodium-calcium.

NHE : échangeur sodium-hydrogène.

NO : oxyde nitrique.

NOS : enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique.

OVLT : organe vasculaire de la lame terminale.
PCR : amplification en chaîne par polymérase.
PLC : phospholipase C.
PKA : protéine kinase A.
PKC : protéine kinase C.
PVN : noyau paraventriculaire.
RCPG : récepteur couplé aux protéines G.
SA : sinusoïdal.
SEM : erreur standard de la moyenne.
SFO : organe subfornical.
SON : noyau supra-optique.
 $V_{1/2}$: voltage de la mi-activation (ou de la mi-inactivation selon le cas) du courant sodique.
 V_m = voltage membranaire.
VIH : virus de l'immunodéficience humain.

RÉSUMÉ :

Introduction : L'apéline est l'agoniste du récepteur APJ-R (putative angiotensin II receptor like), récepteur couplé aux protéines G. Exprimée dans le cœur de plusieurs espèces dont l'homme, l'apéline joue un rôle important dans le système cardiovasculaire. L'apéline a un effet inotrope positif sur le cœur. Szokodi *et al.* ont démontré que cet effet était dû à l'activation de la cascade PLC-PKC et que les échangeurs sodium-hydrogène (NHE) et sodium-calcium (NCX) étaient impliqués. Ils ont également démontré que l'augmentation de la force contractile du myocarde n'était pas due à l'augmentation du courant calcique de type L (I_{CaL}). Nous proposons que l'augmentation de la contractilité est due à un effet de l'apéline sur le courant sodique rapide (I_{Na}). **Matériel et Méthodes :** La localisation du récepteur APJ-R fut faite par immunofluorescence sur des myocytes isolés du ventricule gauche de chien. Les mesures du courant sodique sur ces mêmes cellules furent faites par la méthode de patch-clamp en configuration cellule entière en voltage imposé. L'apéline 13 et l'apéline 17 furent perfusées à des concentrations de 100 nM pendant 20 minutes pour évaluer leurs effets sur le courant sodique. **Résultats :** Le récepteur APJ-R est localisé sur la membrane sarcoplasmique des myocytes au niveau des bandes Z, une structure clé pour la contraction, ce qui nous indique que la localisation du récepteur est propice à la modulation de la contraction cardiaque. L'apéline 13 et l'apéline 17 augmentent I_{Max} du courant sodique de 39% et 61% respectivement comparativement au contrôle. En plus de l'augmentation du courant sodique, les deux formes d'apéline déplacent l'activation du canal sodique de -6,8 mV et -8,6 mV pour l'apéline 13 et 17 comparativement à la condition contrôle. Ce déplacement de l'activation vers des potentiels plus négatifs augmente l'excitabilité des myocytes cardiaques et pourrait ainsi moduler la contraction cardiaque. L'inactivation du canal sodique n'est pas modifiée par la présence des deux formes d'apéline. L'apéline ne modifie donc pas la disponibilité du

canal en fonction du voltage. Le temps de réactivation est significativement augmenté par la présence d'apéline 13 et 17 ce qui a pour effet d'augmenter la période réfractaire au niveau du cœur. **Conclusion :** Le récepteur APJ est bien présent au niveau des bandes Z des myocytes suggérant son implication dans la contraction cardiaque. Nos résultats sur le courant sodique démontrent pour la première fois que l'apéline affecte significativement ce courant et que cette augmentation du courant sodique pourrait être responsable de l'augmentation de la contraction cardiaque par l'apéline.

MOTS CLÉS : Apéline, Récepteur APJ-R, Courant sodique, Effet inotrope positif, Myocytes cardiaque de chien.

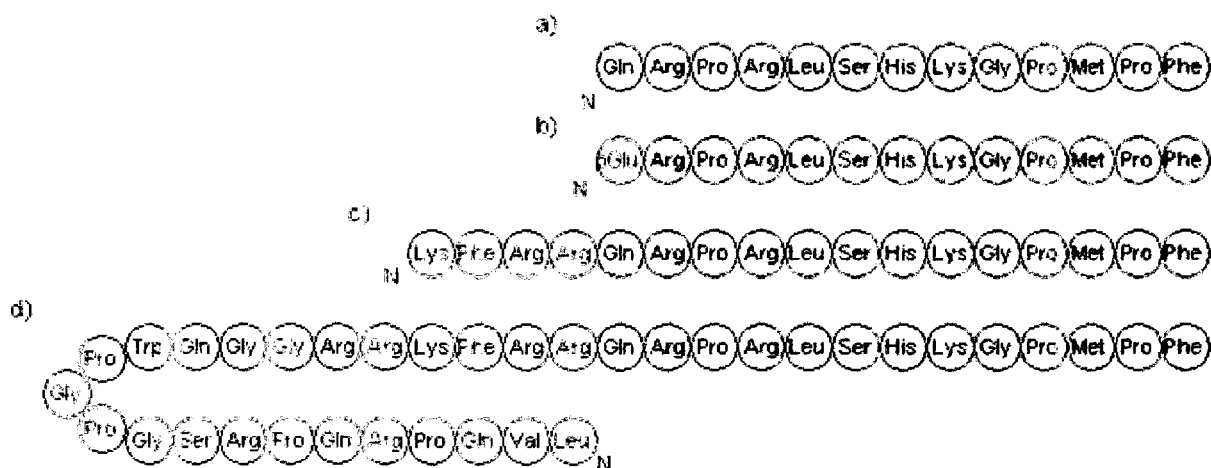
1. INTRODUCTION :

1.1 L'apéline et son récepteur APJ-R

1.1.1. Découverte et caractéristiques générales.

Le système apélinergique a été identifié en 1993 lors du projet du séquençage du génome humain. Par des réactions d'amplifications en chaînes par polymérase (PCR), l'équipe de O'Dowd a découvert un nouveau gène, ne contenant aucun intron dans la séquence codante, qui appartenait à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (O'Dowd et al. 1993). Ce nouveau récepteur se situe au niveau du chromosome 11 à la position q.12 du génome. Il s'agit d'un récepteur de 380 acides aminés comprenant sept domaines transmembranaires avec une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire. Ce récepteur est associé à la protéine inhibitrice G_i , puisqu'il a été démontré par plusieurs études que l'effet de son ligand était inhibé par la toxine pertussis (Hosoya et al. 2000; Masri et al. 2002). O'Dowd et son équipe l'ont nommé récepteur APJ-R pour «putative angiotensin II receptor like» puisque sa séquence d'acides aminés est très similaire au récepteur AT_1 de l'angiotensine II. L'homologie génomique est de 31% avec la séquence de ce dernier et de 54% lors de l'alignement des régions transmembranaires (O'Dowd et al. 1993). Bien qu'il s'agisse de deux récepteurs très similaires, l'angiotensine II n'a pas d'affinité pour le récepteur APJ-R. Ainsi ce nouveau RCPG est demeuré orphelin, sans ligand endogène et ce, jusqu'en 1998.

Son ligand endogène a été découvert par Tatemoto et al. en 1998 à partir d'une série d'extrait d'homogénat de différents tissus. À partir d'un extrait protéique d'estomac de bovin, il a détecté un peptide de 36 acides aminés qui lie le récepteur APJ-R (Tatemoto et al. 1998). L'étude de différents ADN complémentaires du génome humain a permis de déterminer que le gène de ce peptide se situe sur le chromosome X. Il provient d'un peptide précurseur de 77 acides aminés contenant deux exons et un intron; la préproapéline. Il existe une forte homologie (plus de 75%) de la séquence d'acides aminés de la préproapéline. De plus, les 17 derniers acides aminés en C-terminal sont conservés entre les espèces (Lee et al. 2000). La préproapéline est clivée en N-terminal pour former différentes longueurs de fragments identiques en C-terminal. Les principales formes connues sont l'apéline 13 sous sa forme native ou sous sa forme pyroglutamyl, l'apéline 17 et l'apéline 36 (Llorens-Cortès et Beaudet. 2005 ; Kleinz et Daveport. 2005). La forme pyroglutamyl de l'apéline 13 aurait l'avantage de résister plus facilement à une dégradation enzymatique en N-terminal comparativement à sa forme native (Garden et al. 1999). Les différentes formes de l'apéline sont représentées à la figure 1.1.1.



(Kleinz et Daveport. 2005)

Figure 1.1.1 : Séquences d'acides aminés des différentes formes d'apélines. Séquence de l'apéline 13 sous sa forme native (a), de l'apéline 13 sous sa forme pyroglutamyl (b), de l'apéline 17 (c) et de l'apéline 36 (d). La couleur grise représente les acides aminés identiques et le N situe la partie N-terminale.

Les différentes formes d'apélines possèdent une forte affinité pour le récepteur APJ-R, de l'ordre du nanomolaire. L'affinité du peptide est inversement proportionnelle à sa longueur, l'apéline 13 ayant la plus forte affinité et l'apéline 36 la plus faible (Tatemoto et al. 1998).

La formation des différents fragments d'apéline à partir de la préproapéline demeure inconnue jusqu'à maintenant. Les études dans le domaine proposent que l'apéline 36 serait un peptide circulant avec une activité biologique limitée et que lors d'un stimulus, des mécanismes de protéolyse et de modifications post-transcriptionnelles permettraient son clivage en de plus petits peptides beaucoup plus actifs, tel que l'apéline 13 et l'apéline 17 (Kleinz et Daveport. 2005).

Il a été démontré que l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE2), est capable de cliver les différentes formes d'apélines. ACE2 est importante dans la régulation du système cardiovasculaire rénine-angiotensine-aldostérone. Elle est une enzyme protéolytique qui inactive l'angiotensine II et l'angiotensine I. Cette enzyme coupe le dernier acide aminé en C-terminal de l'apéline, la phénylalanine, rendant le peptide inactif. L'efficacité de ACE2 à cliver l'apéline 13 est très similaire à celle de l'angiotensine II, laissant supposer qu'elle peut donc avoir un rôle important pour l'inactivation de l'apéline *in vivo* (Vickers et al. 2002).

1.1.2. La localisation de l'apéline.

L'apéline a été retrouvée dans plusieurs espèces dont les plus étudiées : le rat, la souris, l'homme, le bovin, la grenouille et le chien. L'apéline fut d'abord découverte dans un extrait d'homogénat d'estomac, et elle se retrouve en large quantité dans le système digestif. La protéine et son ARNm ont été détectés chez le rat aux niveaux du cœur, du foie, du rein, des testicules, des ovaires, du tissu adipeux blanc, de la rate, du pancréas et des cellules endothéliales des veines et des artères (Lee et al. 2000; Medhurst et al. 2003; Tatemoto et al. 2001). Une forte quantité de ce peptide a été également détectée aux niveaux des poumons et des glandes mammaires (Habata et al. 1999; Kawamata et al. 2001). Au niveau du cerveau de rat, l'apéline se retrouve dans l'hypothalamus, dans les ponts et dans le noyau arqué. L'apéline est co-localisée avec son récepteur dans le noyau paraventriculaire (PVN) et le noyau supra-optique (SON) de l'hypothalamus, et est co-

localisé dans les cellules exprimant de la vasopressine (AVP) et de son récepteur associé (Reaux et al. 2001; Reaux-Le Goazigo et al. 2004; De Mota et al. 2004).

Chez l'homme, l'apéline a été également détectée au niveau du cortex frontal, de l'hippocampe, du thalamus, et de l'hypothalamus (Lee et al. 2000). L'équipe de Medhurst a détecté sa présence environ aux mêmes endroits que chez le rat, soit aux niveaux du placenta, du rein, du poumon et de la glande mammaire (Medhurst et al. 2003). Plusieurs études ont démontré la présence de ce peptide au niveau du cœur (Medhurst et al. 2003; Földes et al. 2003; Kleinz et Daveport. 2004). Kleinz et Daveport ont déterminé que l'apéline est présente dans tout le système cardiovasculaire; le cœur, le rein, la glande surrénale, les cellules endothéliales cardiaques et l'endothélium des petits et grands vaisseaux sanguins. Cette localisation ubiquitaire dans ce système suggère que l'apéline et son récepteur ont un rôle physiologique important à jouer dans la régulation du flot sanguin (Kleinz et Daveport. 2004).

1.1.3. La localisation du récepteur APJ-R.

Le récepteur de l'apéline a été d'abord identifié chez l'homme, et se retrouve dans plusieurs espèces mammifères, tels que le rat, la souris, le singe, et on le retrouve également chez le poisson et la grenouille. L'ARNm du récepteur APJ-R est présent dans la plupart des tissus périphériques. Chez le rat, les niveaux d'ARNm de l'APJ-R sont élevés au niveau des tissus très vascularisés tels que le poumon et le cœur (Hosoya et al. 2000; O'Carroll et al. 2000). Des niveaux plus faibles d'ARNm de la protéine sont également observés au niveau du rein, de l'ovaire et du muscle squelettique (O'Carroll et

al. 2000). En ce qui concerne la protéine, une grande quantité est détectée au niveau du cerveau de rat et ce, dans plusieurs régions telles que le cortex, l'hypothalamus, l'hippocampe, l'hypophyse, le noyau paraventriculaire (PVN) et le noyau supraoptique (SON) (Lee et al. 2000; O'Carroll et al. 2000).

Chez l'homme, l'équipe d'Edinger a démontré la présence du récepteur dans plusieurs tissus tels que le système nerveux (périphérique et central), la rate, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires, l'intestin et le cerveau (Edinger et al. 1998). Les études d'immunoréactivité ont permis de localiser le récepteur dans le système cardiovasculaire. En effet, le récepteur a été localisé aux niveaux des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et des cardiomyocytes (cellules musculaires cardiaques) (Kleinz et al. 2005). La localisation ubiquitaire dans ce système suggère que l'apéline et son récepteur ont un grand rôle physiologique à jouer dans la régulation du flot sanguin.

Le tableau 1.1.1 résume les différentes études de la localisation tissulaire de l'ARNm du récepteur APJ-R et de l'apéline chez le rat, la souris et l'homme.

Distribution of APJ and apelin mRNA in rat mouse and human

	APJ			Apelin		
	Rat	Mouse	Human	Rat	Mouse	Human
Brain	++	+	+++	+	+++	++
Cerebellum	+		+	+		+
Pituitary	+		+	+		++
Spinal cord	+++	++	+	++		++
Adrenal gland	+			+		
Thyroid	++					
Spleen	—	+	+++	—	+	
Thymus		+	+		—	
Heart	++	+++	+	++	++	+
Endothelial cells	++					
Lung	+++	++	++	+++	++	+
Stomach	+		+	+		—
Small intestine	+		++	+		—
Large intestine	+		++	+		
Liver	+	+		—	—	—
Pancreas	—		+	—		+
Kidney	+	+	+	+	+	+
Testis	+	+	+	+	++	+
Prostate			+			+
Ovary	+	+	+	+	+	
Uterus	+	+	+	+	—	—
Placenta	++		++			+++
Mammary gland	+			++		
Skeletal muscle	++	++	+	+	+	—
Adipose tissue	++			+		
Cartilage	++					

(Kleinz et Daveport. 2005)

Tableau 1.1.1. : Distribution de l'ARNm du récepteur APJ-R et de l'apéline chez le rat (rat), la souris (mouse) et l'homme (human) dans différents organes.

1.2. Les effets physiologiques du système apélinergique.

1.2.1 Quelques effets généraux de l'apéline :

Plusieurs études ont déjà démontrées que l'apéline a des effets physiologiques sur plusieurs systèmes. L'apéline a la propriété d'augmenter la mitogénèse de plusieurs cellules : les cellules endothéliales vasculaires, les cellules enterochromafines gastriques et les ostéoblastes (Masri et al. 2004 ; Kasai et al. 2004 ; Wang et al. 2004 ; Xie et al. 2006). Découvert dans l'estomac, des études ont démontré que l'apéline produit une augmentation de la relâche de l'hormone CCK et de l'histamine accompagnée par une diminution de la relâche d'acide gastrique (Wang et al. 2004 ; Lambrecht et al. 2006). Elle aurait donc un effet protecteur sur l'estomac. L'apéline inhibe la sécrétion d'insuline au niveau des cellules du pancréas (Sörhede Winzell et al. 2005) créant de cette façon un lien entre le diabète, les maladies cardiovasculaires et l'obésité, puisqu'il est démontré que les taux d'apéline chez les obèses sont augmentés, tout comme l'insuline (Boucher et al. 2005).

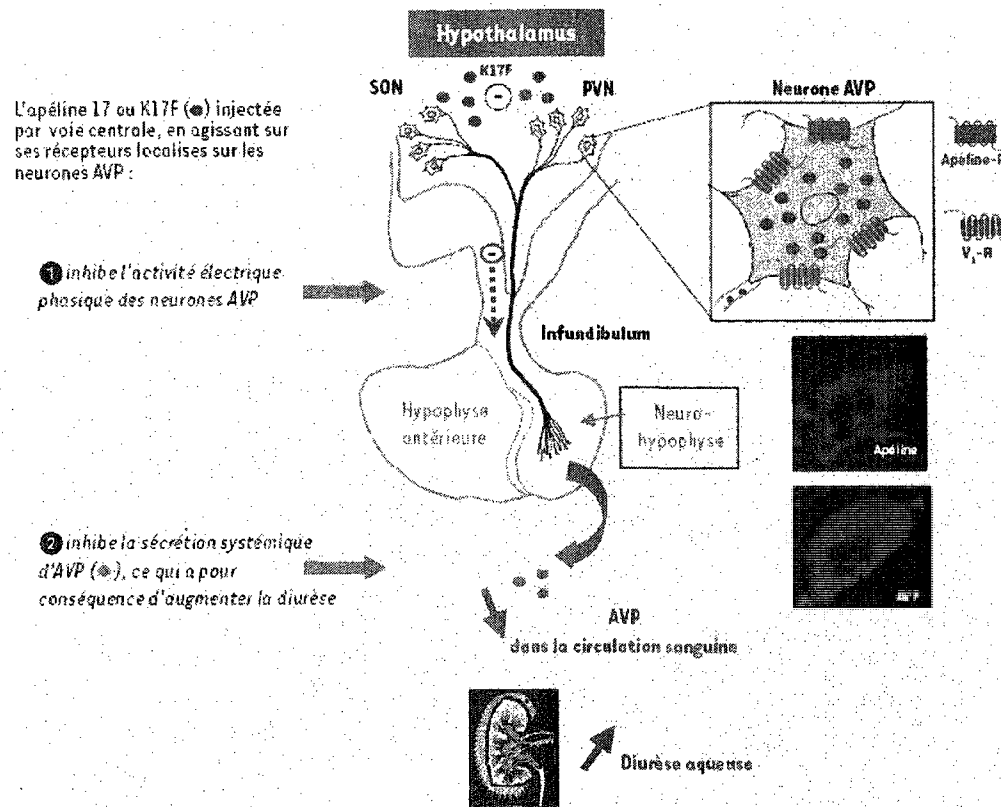
1.2.2. Les effets diurétiques.

Sa forte présence dans le cerveau et particulièrement dans l'hypothalamus suggère que l'apéline est impliquée dans la régulation centrale de différents systèmes. L'équipe de Reaux a été la première à déterminer que l'apéline a des effets sur l'homéostasie liquidienne. Par l'injection intra-cébro-ventriculaire (ICV) de l'apéline 17 chez le rat, ils ont observé une diminution de la relâche sanguine de AVP (neurohormone anti-diurétique) au niveau de l'hypophyse postérieure. Ils supposent donc que l'apéline, via son récepteur APJ-R, peut inhiber l'activité neuronale des cellules AVP du SON (Reaux et al. 2001).

L'équipe de De Mota a confirmé l'implication de l'apéline dans l'équilibre hydrique. Ils ont démontré que l'apéline et l'AVP sont co-localisées dans les cellules du SON et PVN. L'activité phasique électrique de ces neurones AVP est inhibée en présence d'apéline menant ainsi à une diminution plasmatique d'AVP et à une augmentation de la diurèse (De Mota et al. 2004). Chez le rat déshydraté, ils ont observés qu'il y a une diminution plasmatique d'apéline et une augmentation de sa concentration dans les noyaux hypothalamiques. Les auteurs ont conclu que l'AVP et l'apéline sont en relation d'antagoniste. Les deux peptides peuvent agir de façon autocrine sur les neurones AVP et sont deux régulateurs importants dans le contrôle de l'homéostasie liquidienne de l'organisme par l'hypothalamus; l'AVP agissant comme hormone ayant un effet anti-diurétique et l'apéline comme une hormone ayant un effet diurétique.

Ces résultats obtenus chez le rat ont été confirmés également chez l'homme. Azizi et son équipe ont observé chez dix sujets humains, que l'augmentation de l'osmolarité sanguine induisait une augmentation plasmatique d'AVP et une diminution d'apéline (Azizi et al. 2008). Inversement, une diminution de l'osmolarité sanguine induisait l'effet contraire, une augmentation de la concentration plasmatique d'apéline avec une diminution d'AVP. Ainsi, cette étude suggère que la régulation de l'équilibre hydrique par l'apéline tel qu'observé chez le rat est également présente chez l'homme.

La figure 1.2.2. représente un résumé de la régulation croisée entre l'apéline et l'AVP au niveau de l'hypothalamus et l'effet de diurèse chez le rat.



(Llorens-Cortès et Beaudet en 2005)

Figure 1.2.2. : Action centrale de l'apéline 17 (K17F). Chez la rate en lactation, l'apéline 17 (K17F) inhibe l'activité électrique phasique des neurones magnocellulaires AVP et la sécrétion systémique de l'AVP, provoquant une augmentation de la diurèse aqueuse. Les deux photographies d'immunofluorescence à droite de la figure représentent le corps cellulaire d'un neurone magnocellulaire marqué avec un anticorps dirigé contre l'AVP (en rouge) et avec un anticorps dirigé contre l'apéline (en vert).

Les résultats de l'inhibition de l'activité électrique par l'apéline aux niveaux des neurones sont très intéressants dans le rôle de l'apéline sur le coeur. En effet, ce dernier contient un

système de conduction électrique du potentiel d'action composé de cellules situées au niveau du nœud sinoïdal (SA), du nœud auriculo-ventriculaire (AV), du bulbe de Hiss et des fibres de Purkinje. Le même mécanisme de l'inhibition de la conduction électrique neuronale par l'apéline pourrait être actif dans le système de conduction cardiaque. Comme le courant sodique correspond à la phase 1 du potentiel d'action, une modification de ce courant pourrait expliquer la perte de l'activité électrique des neurones en présence d'apéline.

1.2.3. Les effets vasculaires.

La localisation du récepteur APJ-R et de l'apéline aux niveaux des cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire supporte l'hypothèse d'une fonction physiologique vasculaire pour l'apéline. Lee et son équipe ont été le premier groupe à démontrer que l'apéline diminue la pression sanguine pendant plusieurs minutes chez le rat anesthésié lorsque injectée en intraveineux (IV) (Lee et al. 2000). Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes qui ont aussi démontré que la diminution de la pression sanguine est accompagnée d'une augmentation du rythme cardiaque (Reaux et al. 2001; El Messari et al. 2004; Tatemoto et al. 2001). Cette augmentation du rythme cardiaque est par contre un réflexe au niveau du système nerveux autonome face à la diminution de la pression sanguine. En effet, Cheng et son équipe ont démontré que la tachycardie induite par l'apéline peut être inhibée par un blocage des ganglions parasympathiques. Ce bloc n'a toutefois pas d'influence sur la pression sanguine, l'apéline produit toujours son effet dilatateur veineux et artériel (Cheng et al. 2003). Ainsi, d'après les études vasculaires de l'apéline, ce peptide ne semble pas affecter l'excitabilité cardiaque par une modification

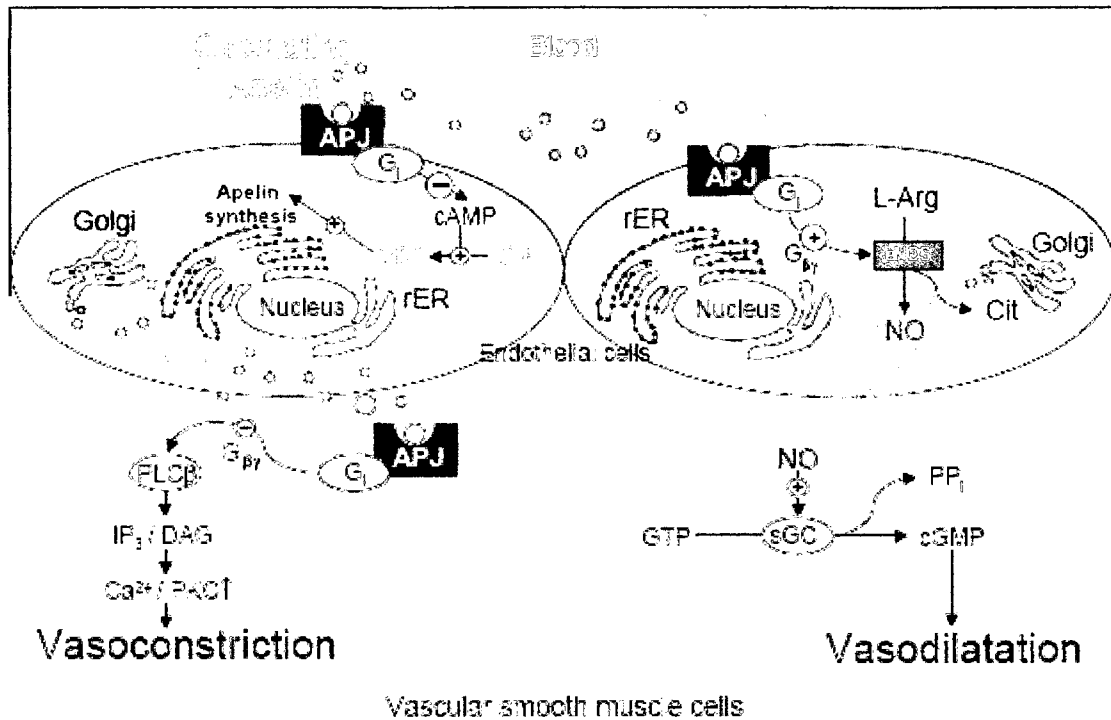
de son rythme, bien que toutefois, cette hypothèse soit controversée dans la littérature (Reaux et al. 2001; El Messari et al. 2004; Tatemoto et al. 2001).

Le mécanisme d'action de l'effet vasodilatateur de l'apéline semble être le même que celui de la bradykinine; la production de d'oxyde nitrique (NO). En effet, Tatemoto et son équipe ont déterminé que la chute de pression sanguine est abolie par le L-NAME, un inhibiteur de l'enzyme de la synthèse de l'oxyde nitrique (NOS) (Tatemoto et al. 2001). L'équipe de Jia a confirmé que l'apéline agit via cette voie. Ils ont observé que l'apéline augmente la production de nitrates (NO_2^-), l'activité catalytique de NOS constitutive dépendante du calcium, la capture de L-arginine et l'expression de NOS sur des aortes isolées non dénudées d'endothélium (Jia et al. 2007). L'apéline peut ainsi, via son récepteur APJ-R, activer la NOS dans les cellules endothéliales vasculaires, permettre la transformation de L-arginine en L-citruline, ce qui induit la relâche de NO sur les muscles lisses vasculaires sous-jacents. Le NO peut activer la guanylate cyclase dans ce tissu et augmenter la concentration intracellulaire de GMPc (Figure 1.2.3 section de droite). Ce dernier induit une vasorelaxation du muscle en favorisant une diminution de la concentration intracellulaire de calcium. Il peut également activer les canaux potassiques ce qui amène une hyperpolarisation de la cellule et diminue ainsi l'excitabilité cellulaire, et par conséquent la contraction. (Cohen et Vanhoutte 1995).

Toutefois, l'apéline sous certaines conditions peut induire une vasoconstriction du muscle lisse. Katugampola a démontré cet effet sur la veine saphène humaine dénudée d'endothélium (Katugampola et al. 2001). Le mécanisme d'action de ce processus a été expliqué par l'équipe de Hashimoto, tel qu'illustré à la section de gauche de la figure

1.2.3. Ils ont déterminé que l'activation du récepteur APJ-R au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires permet l'activation de la protéine $G_{i/o}$, de la protéine kinase C (PKC), des échangeurs sodium-hydrogène (NHE) et sodium/calcium (NCX). Cette cascade a pour effet d'augmenter le calcium intracellulaire et la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine dans ce tissu et par conséquent d'augmenter la contraction musculaire (Hashimoto et al. 2006). Les auteurs laissent supposer que l'effet contradictoire de l'apéline sur les vaisseaux dénudés ou non dénudés d'endothélium serait d'autant plus important lors de pathologies. En conditions physiologiques, l'apéline pourrait induire une vasorelaxation des vaisseaux par une production de NO de l'endothélium et diminuer la pression sanguine, tandis que l'on peut spéculer qu'en conditions pathologiques telle que l'artériosclérose, l'apéline pourrait avoir un accès direct au muscle et produire une vasoconstriction (Hashimoto et al. 2006).

La figure 1.2.3 résume les différents effets de l'apéline aux niveaux de l'endothélium et du muscle vasculaire lisse.



(Kleinz et Daveport. 2005)

Figure 1.2.3. : Effets vasculaires de l'apéline. *À gauche* : L'effet vasoconstricteur de l'apéline sur le vaisseau dénudé d'endothélium. *À droite* : L'effet vasodilatateur de l'apéline sur le vaisseau non dénudé d'endothélium.

L'effet contradictoire de la vasorelaxation et de la vasoconstriction est d'autant plus intéressant lorsque l'on compare ses effets avec le muscle cardiaque. Le muscle cardiaque a une plus grande probabilité de se comporter comme le muscle vasculaire en présence d'apéline. En effet, le muscle cardiaque ne possède pas de cellules endothéliales. Ainsi, la liaison de l'apéline sur son récepteur APJ-R dans ce type cellulaire ne peut engendrer une production de NO et une relaxation du muscle cardiaque. Par contre, l'apéline pourrait aller se lier directement sur les cardiomyocytes, et induire une contraction par l'activation de la protéine G_i , de la PKC et des échangeurs NHE et

NCX. D'ailleurs, l'équipe de Szokodi a démontré que l'apéline induit une augmentation de la force de contraction du cœur supportant d'autant plus cette hypothèse (Szokodi et al. 2002).

1.3. Les effets cardiaques de l'apéline.

Les premières études expérimentales sur le rôle physiologique cardiaque de l'apéline ont démontré que cette hormone augmente sa force de contraction. Les études de localisation de l'apéline et de son récepteur laissaient supposer un rôle physiologique puisque leurs expressions protéiques sont en grande quantité dans cet organe. Szokodi et son équipe ont été les premiers à démontrer que l'apéline a un effet inotrope positif (augmentation la force de contraction du cœur). L'apéline est l'agent endogène le plus puissant, avec la moitié de son effet maximal (EC_{50}) à une concentration de 33pM. Les auteurs ont observé que l'effet de l'apéline sur les cœurs isolés de rats est en partie à la protéine G_i ou G_o , mais que l'effet de la protéine $G_{q/11}$ n'est pas complètement exclu. Ils ont démontré que l'effet inotrope de l'apéline est également dû à l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la PKC, et que les échangeurs NHE et NCX sont également impliqués. L'activité des échangeurs NHE et NCX dépend de la force électromotrice, qui elle dépend du potentiel membranaire ainsi que des différentes concentrations des ions impliqués. Des modifications des concentrations intracellulaires de sodium, d'hydrogène et de calcium vont donc pouvoir moduler les échangeurs NHE et NCX. Une dernière observation importante de cette étude porte sur les différents courants cardiaques. L'apéline ne modifie pas les courants calciques ni les courants potassiques. Ainsi, Szokodi a prouvé pour la première fois que l'apéline a un effet inotrope positif lent, indépendant du courant

calcique, mais soutenue au niveau du cœur (Szokodi et al. 2002). Toutefois, l'effet de l'apéline sur le courant sodique, courant responsable de la dépolarisation initiale et un important modulateur de la concentration intracellulaire de sodium, n'a pas été évalué.

Les études subséquentes sur le sujet se sont par la suite intéressées à l'action de l'apéline lors de pathologies cardiaques. Plusieurs études animales ont démontré que l'apéline a un effet inotrope positif tant sur des cœurs normaux que sur des cœurs insuffisants cardiaques (Berry et al. 2004 ; Jia et al. 2005 ; Dai et al. 2006 ; Farkasfalvi et al. 2007). Plus particulièrement, Dai et son équipe ont démontré que l'effet dose-dépendant de l'apéline est dû à une augmentation de calcium intracellulaire au niveau de myocytes cardiaques plutôt qu'une augmentation de la sensibilité des myofilaments contractiles au calcium (Dai et al. 2006). Cette étude est contradictoire avec une étude subséquente de Farkasfalvi et al. (2007) qui ont démontré que l'apéline induit un rétrécissement des sarcomères dans des myocytes isolés. Le mécanisme de l'effet inotrope positif n'est par contre pas dû à une augmentation du calcium intracellulaire, mais à une augmentation de l'activité de l'échangeur NHE. L'activité de cet échangeur dépend en partie des modifications du sodium et d'hydrogène intracellulaires. L'alcalinisation intracellulaire de la cellule produite par l'augmentation de l'activité de cet échangeur a pour effet d'augmenter la sensibilité au calcium des myofilaments, et ainsi d'augmenter la contraction cardiaque (Farkasfalvi et al. 2007).

Cette étude a été également la première à démontrer que l'apéline accélère la propagation du potentiel d'action cardiaque dans une couche cellulaire de cardiomyocytes de nouveau-nés. L'augmentation de l'excitabilité cellulaire est directement reliée avec la localisation

du récepteur APJ-R situé au niveau des structures impliquées dans la conduction cardiaque tels que les T-tubules et les disques intercalaires. Cette augmentation de l'excitabilité cardiaque peut également être reliée aux différents courants ioniques du potentiel d'action cardiaque. Comme Szokodi n'a observé aucun effet de l'apéline sur les courants calciques et potassiques, il est possible qu'elle modifie le courant sodique responsable de la dépolarisation des myocytes.

Le mécanisme exact par lequel l'apéline induit une augmentation de la contraction cardiaque demeure toujours inconnu. Toutefois, son implication sur le système cardiaque est indéniable, particulièrement lors de pathologies. Plusieurs études animales ont démontré que l'apéline produit une augmentation de la contraction cardiaque chez des cœurs insuffisants (Berry et al. 2004 ; Jia et al. 2005 ; Dai et al. 2006 ; Farkasfalvi et al. 2007). Les études d'expression de l'apéline et de son récepteur APJ-R ont démontré l'importance de ce système en pathologie. L'expression de l'apéline et de son récepteur est effectivement diminuée lors d'insuffisance cardiaque chez le rat (Jia et al. 2005 ; Szokodi et al. 2002 ; Iwanaga et al. 2006). La diminution de l'expression de cette hormone lors de l'infarctus pourrait accélérer la détérioration du cœur, puisque les effets bénéfiques de l'apéline (vasodilatateur, hypotenseur et inotrope positif) sont diminués. L'apéline semble également avoir un effet cardio-protecteur si elle est perfusée pendant une ischémie. Kleinz et Baxter ont démontré que son expression est augmentée lors d'ischémie (Kleinz et Baxter. 2008). Kuba et ses collaborateurs ont quant à eux observés que les souris déficientes du gène de l'apéline développent des pertes de contractilité cardiaque avec l'âge et finissent par souffrir d'insuffisance cardiaque (Kuba et al. 2007). Les études animales ont donc démontrées que l'apéline a des effets cardioprotecteur.

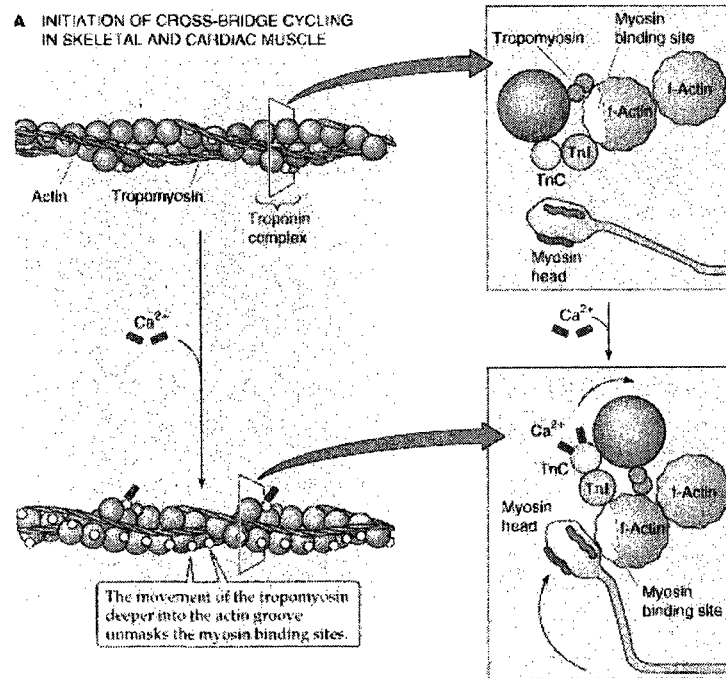
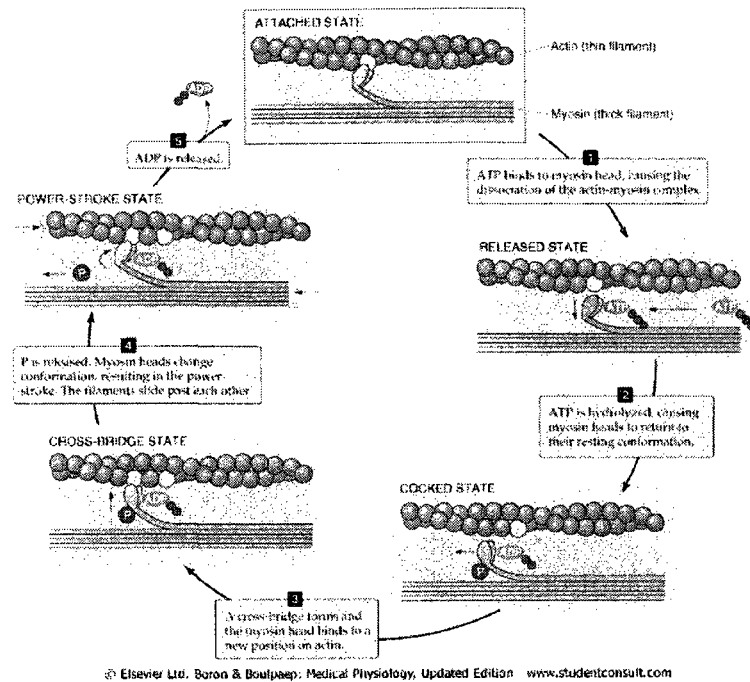
Les études sur l'homme démontrent également certains liens entre diverses pathologies et le système apélinergique. Földes et al. ont évalué les concentrations plasmatiques d'apéline chez une population d'insuffisant cardiaque (IC) et ces derniers ont des concentrations d'apéline significativement moins élevées que le groupe contrôle (Földes et al. 2003). Chen et son équipe ont quant à eux déterminé que l'apéline circulante est augmentée lors d'une dysfonction du ventricule gauche. Ils ont aussi observé que les niveaux protéiques d'apéline et du récepteur APJ-R sont augmentés dans les stades précoces I et II de l'IC, mais qu'il diminuait à des niveaux sous la normale lors des stades tardifs III et IV de la pathologies (selon le NYHA) (Chen et al. 2003).

D'autres études dans de plus grosses cohortes ont confirmé les résultats de Földes où l'IC est associé avec une diminution de la concentration plasmatique d'apéline, et ce, à tous les stades d'IC (Goetze et al. 2005 ; Chong et al. 2006 ; Francia et al. 2006). Toutes ces études démontrent bien qu'il existe un lien entre l'insuffisance cardiaque et les niveaux d'apélines. La plupart des auteurs supposent que l'apéline est une hormone qui agirait de façon compensatoire à la diminution de la force de contraction du ventricule gauche. Toutefois, en IC, l'apéline n'est plus exprimée, son effet bénéfique est absent, favorisant ainsi la progression de la pathologie. Ce qui est certain, c'est que le système apélinergique a bien un rôle à jouer dans les pathophysiologies cardiaques et que son étude est primordiale. La découverte d'un agoniste non-peptidique du récepteur APJ-R de l'apéline pourrait également mener à une nouvelle médication dans le traitement de l'IC.

1.4 : Les mécanismes de la contraction cardiaque.

Nous ferons ici un bref rappel des mécanismes impliqués dans la contraction cardiaque.

L'homéostasie calcique est un élément crucial dans la contraction cardiaque. À l'état basal, sans stimulation électrique, le calcium intracellulaire libre est à une concentration de l'ordre du nanomolaire. La contraction cardiaque est effectuée lorsque les têtes de myosines se lient aux filaments d'actines et induisent le raccourcissement des sarcomères. Lorsque la concentration de calcium intracellulaire est faible, les têtes de myosines ne peuvent pas se lier aux filaments d'actine puisque le complexe de la troponine induit un encombrement stérique sur les filaments d'actines, empêchant l'interaction entre les deux. Cet encombrement stérique est déplacé par la liaison du calcium sur la troponine C lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induisant un déplacement du complexe de la troponine. Le site de liaison de la tête de myosine sur les filaments d'actines est libéré. La myosine peut aller s'y lier et induire la contraction cardiaque. La figure 1.4.1 représente les mécanismes de contraction impliquant les filaments de myosines et d'actines, l'implication du calcium et du complexe de la troponine.



(Boren et Boulpaep. 2005)

Figure 1.4.1 : Mécanisme de la contraction musculaire cardiaque impliquant les filaments de myosines et d'actines. *En haut:* Mécanisme de contraction entre les filaments d'actines et les myosines. 1 : L'ATP (adénosine triphosphate) lie la tête de myosine, ce qui permet

la relâche du complexe tête de myosine/actine. 2 : L'ATP est hydrolysé en ADP (adénosine diphosphate), la tête de myosine est phosphorylée ce qui permet à la tête de myosine de retourner à l'état relaxé. 3 : L'augmentation du calcium intracellulaire permet la liaison de la tête de myosine au filament d'actine. 4 : La déphosphorylation de la tête de myosine permet la flexion de celle-ci et le raccourcissement des sarcomères, et par conséquent, la force de contraction. 5 : L'ADP est libéré du complexe. *En bas* : Le complexe de la troponine produit un encombrement stérique avec le site de liaison de la tête de myosine sur le filament d'actine. L'augmentation du calcium intracellulaire permet la liaison de l'ion au niveau de la troponine C. Ceci crée un déplacement du complexe troponine et rend accessible le site de liaison à la tête de myosine.

Tel que mentionné ci haut, pour que la contraction se produise, il faut tout d'abord une augmentation de la concentration de calcium à l'intérieur du myocyte cardiaque. Cette élévation est déclenchée par le potentiel d'action cardiaque de la cellule. Le potentiel d'action est tout d'abord généré au niveau du nœud SA situé au dessus des oreillettes et se propage tout le long des celles-ci provoquant leurs contractions. Une fois le potentiel arrivé au niveau du nœud AV, il se propage le long des faisceaux de Hiss, des fibres de Purkinje, des ventricules, ce qui permet leurs dépolarisations. Ces dernières induisent leurs contractions de l'apex vers la base du cœur pour permettre l'éjection du sang dans l'aorte et le tronc pulmonaire.

La conduction électrique tout le long de ces structures est assurée par le potentiel d'action cardiaque qui est divisé en cinq phases (0 à 4) tel que représenté à la figure 1.4.2. Tout d'abord, lorsque la cellule est à l'état de repos, le potentiel membranaire est autour de -90

mV et les canaux sont à l'état fermé. Il s'agit de la phase 4 où la cellule est au repos. Le stimulus électrique provenant du nœud AV (ou de l'activité pacemaker du nœud SA pour les oreillettes) permet aux myocytes d'entrer en phase 0 du potentiel d'action, soit la dépolarisation membranaire. Cette phase est caractérisée par l'ouverture des canaux sodiques cardiaques voltage-dépendants. Ils permettent l'entrée de sodium à l'intérieur des myocytes, ce qui a pour effet de modifier le potentiel de la membrane, le menant à environ +20mV. La dépolarisation membranaire induit l'ouverture de deux autres types de canaux voltage-dépendants ; les canaux calciques et potassiques durant la phase 1 du potentiel. La sortie du potassium à l'extérieur du myocytes induit une petite repolarisation. La phase 2 est nommé la phase plateau. Il y a un équilibre entre les courants entrant, tel que le courant calcique, et les courants sortant, tels que les courants potassiques. Ce phénomène maintient le voltage de la membrane à des niveaux stables, aux alentours de 0mV. L'entrée de calcium extracellulaire se fait principalement durant cette phase plateau. Par la suite, la fermeture progressive des canaux calciques amène une repolarisation de la membrane. Les courants potassiques sortant permettent la sortie de potassium ce qui caractérise la phase 3. Enfin, lorsque la membrane est de retour à des potentiels de -90mV, la cellule est maintenant au repos, à la phase 4, où les canaux retournent à l'état fermé (Katz. 2001).

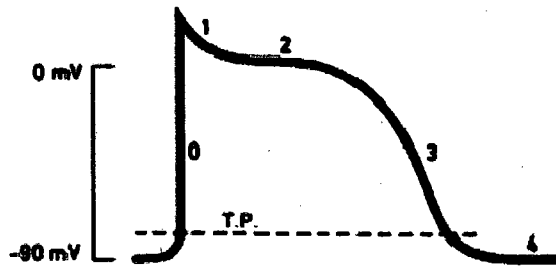


Figure 1.4.2 : Potentiel d'action cardiaque. Le potentiel membranaire est fonction du temps. Le T.P. signifie le potentiel seuil du déclenchement du potentiel d'action.

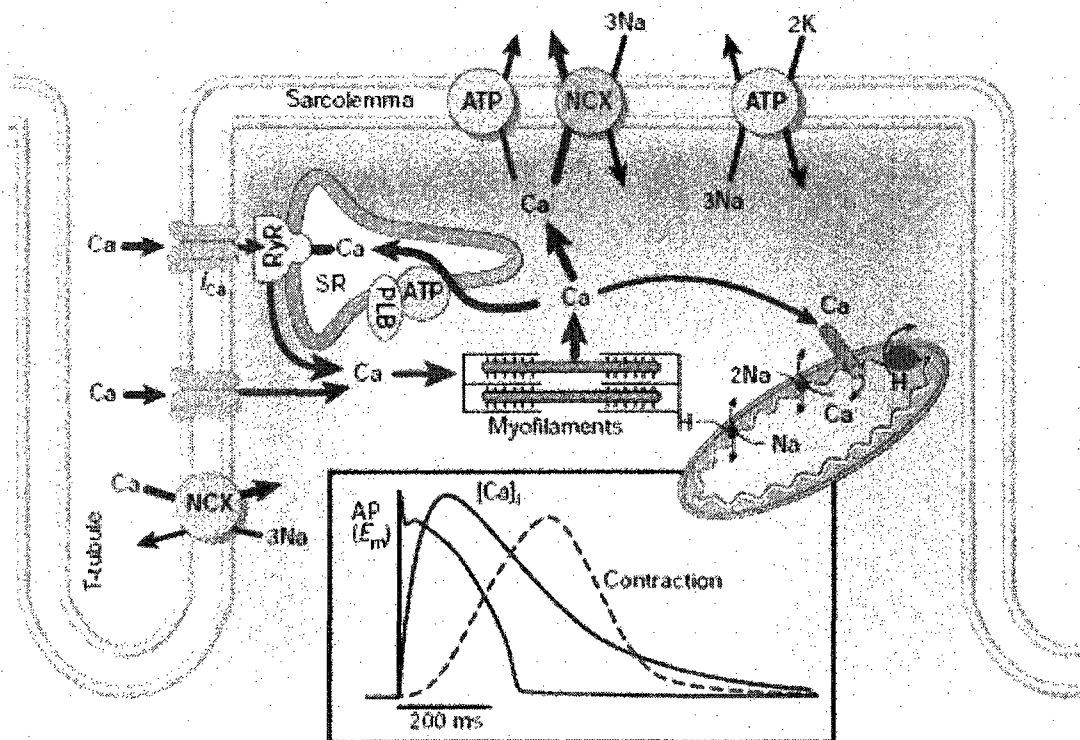
Des modifications des différents courants vont directement affecter le potentiel d'action, soit en le prolongeant ou en le diminuant. La modification du potentiel d'action va donc également produire des modifications sur la contraction subséquente des myocytes. Par exemple, une diminution de l'amplitude du courant sodique peut induire une plus faible dépolarisation, diminuant l'amplitude du potentiel d'action et donc induire une mauvaise contraction cardiaque et vice-versa. Ainsi, la régulation des courants ioniques est très importante dans la régulation de la contraction cardiaque.

L'augmentation du calcium intracellulaire débute par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants dans la phase 1 et 2 du potentiel d'action cardiaque qui vont à leur tour déclencher le mécanisme de relâche de calcium induite par le calcium (RCIR). Les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique qui lient le calcium provenant de l'espace extracellulaire, vont libérer le réservoir de calcium contenu dans cette organelle. Ce dernier est la principale source de calcium pendant la contraction.

La régulation du calcium est critique pour la régulation de la contraction des myocytes cardiaques. Les concentrations doivent être continuellement modifiées afin de permettre la systole (contraction ventriculaire) par une augmentation du calcium intracellulaire, mais également pour permettre la diastole (relaxation ventriculaire) par une diminution de ce même calcium intracellulaire. En effet, si le calcium intracellulaire était toujours élevé, la cellule serait en contraction constante, amenant le cœur à être tétanisé ce qui l'empêcherait de remplir sa fonction de pompe pour la circulation sanguine.

Plusieurs systèmes dans les myocytes existent afin de permettre une bonne extrusion du calcium après la contraction. Tout d'abord, la majorité du calcium est repompée à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique et des mitochondries à partir de la pompe calcium-ATPase. Une autre partie est exclue du cytosol par cette pompe au niveau de la membrane sarcoplasmique. Enfin, l'échangeur NCX au niveau de la membrane permet la sortie d'un ion calcium par l'entrée de trois ions sodium dans le cytosol. Cet échange se produit principalement à la fin du potentiel d'action, lorsque le calcium intracellulaire est en grande quantité. Il est important de noter que cet échangeur peut également agir en mode inverse ; une entrée de calcium en échange d'une sortie d'ions sodium. Ce mode inverse est effectif lorsque la force électromotrice est inversée, qui elle est fonction du potentiel membranaire et des concentrations intra et extra cellulaires des ions sodium et calcium (Katz. 2001). Dans la phase 0 du potentiel d'action, tous ces paramètres sont modifiés ayant pour effet d'inverser la force électromotrice et de reverser les échanges d'ions.

Des modifications de ces mécanismes d'exclusion du calcium dans les myocytes peuvent être responsables de l'effet inotrope positif de l'apéline. Une diminution de la vitesse d'exclusion du calcium peut augmenter la force de la contraction ventriculaire. Ce mécanisme d'exclusion du calcium explique l'implication de l'échangeur NCX par Szokodi dans l'effet inotrope positif de l'apéline (Szokodi et al. 2002). La figure 1.4.3 est une schématisation de la régulation du calcium au niveau du myocyte.



(Bers 2002)

Figure 1.4.3 : Régulation du calcium intracellulaire dans une cellule cardiaque. L'encadré démontre la relation avec le temps du potentiel d'action (AP), de la concentration intracellulaire du calcium transitoire ($[Ca]_i$) et de la contraction mesurés dans un myocyte

de lapin à 37.7°C. RyR = récepteur à la ryanodine. E_m = potentiel membranaire. PLB = phospholamban. SR = réticulum sacroplasmique.

Il y a deux méthodes pour augmenter la force de contraction cardiaque. Premièrement, la sensibilité au calcium de la troponine C peut être modifiée. Une alcalinisation intracellulaire peut augmenter la capacité du calcium à se lier au complexe de la troponine C. Une élévation de pH cytosolique peut donc augmenter la contraction cardiaque avec une même concentration de calcium intracellulaire. (Krämer et al. 1991 ; Kang and Walker, 2006). Une augmentation de l'activité de l'échangeur NHE peut modifier entre autre le pH. Lorsque l'activité est augmentée, la vitesse d'échange permet une plus grande entrée de sodium intracellulaire accompagnée par une sortie d'hydrogène à l'extérieur de la cellule induisant l'élévation de pH. L'équipe de Farkasfalvi supporte l'hypothèse que l'apéline augmente la sensibilité au calcium puisqu'ils ont observé une activation de NHE menant à une élévation du pH en présence d'apéline ce qui aurait pour effet d'augmenter la sensibilité des myofilaments et ainsi de produire l'effet inotrope positif (Farkasfalvi et al. 2007). Toutefois, ces résultats demeurent controversés puisque l'équipe de Dai a spécifiquement démontré que l'apéline ne modifie pas la sensibilité des myofilaments au calcium (Dai et al. 2006).

Deuxièmement, le calcium intracellulaire peut être augmenté, ce qui a pour effet d'augmenter le nombre de site de liaison sur les filaments d'actines disponibles aux têtes de myosines. Ceci permet à un plus grand nombre de têtes d'aller se lier, d'augmenter le raccourcissement des sarcomères et d'augmenter la force de contraction. L'augmentation du courant calcique, l'augmentation de la libération du calcium du réticulum

sarcoplasmique, la diminution de l'exclusion de calcium par NCX ou l'augmentation de l'activité de l'échangeur NCX en mode inverse sont des facteurs responsables d'une augmentation du calcium intracellulaire. L'étude de Szokodi a démontré que l'apéline n'a aucun effet sur le courant calcique excluant donc ce mécanisme. Ils ont toutefois déterminé que l'échangeur NCX a une certaine implication dans l'effet inotrope positif de l'apéline (Szokodi et al. 2002).

Nous supposons que l'effet inotrope positif de l'apéline serait effectivement lié à l'échangeur NCX, mais par un mécanisme différent de l'activation directe de la PLC-PKC et des échangeurs NHE et NCX proposé par Szokodi. Nous proposons l'hypothèse suivante ; l'apéline produit son effet inotrope positif par une augmentation du courant sodique au niveau des myocytes. Cette augmentation du courant modifie par la suite les concentrations intracellulaires de sodium ce qui mène à une augmentation du mode inverse de l'échangeur NCX, une diminution de la vitesse d'échange de ce dernier en mode standard et donc une augmentation de calcium intracellulaire. L'augmentation des concentrations intracellulaires de sodium a été largement associée dans la littérature à un effet inotrope positif (Alvarez et al. 1999 ; Bers et al. 2002 ; Mills et al. 2007).

1.5. Le courant sodique cardiaque :

Le courant sodique cardiaque est un courant entrant qui laisse pénétrer les ions sodium extracellulaires (concentration de 140mM) dans le cytosol (concentration de 10mM). La membrane sarcoplasmique n'est pas perméable au sodium, et ce dernier doit donc passer par des canaux sélectifs, les canaux sodiques voltage-dépendants, pour induire un courant

positif entrant et une dépolarisation membranaire. Plusieurs sous-types de canaux sodiques se retrouvent dans l'organisme. Le sous-type $\text{Na}_v1.5$ est le plus fortement exprimé dans le cœur. Ce sous-type est caractérisé par une résistance à la tétrodotoxine tandis que les autres sous-types neuronaux et musculaires sont sensibles à cette toxine. Il est codé par le gène *SCN5A* et code pour la sous-unité α du canal de 2016 acides aminés. La protéine est formée de quatre différents domaines (domaine I à IV) où chacun est constitué de six segments transmembranaires (S1 à S6). Le pore du canal est composé par quatre P-loop situés entre les segments transmembranaires 5 et 6 des quatre domaines du canal. L'assemblage des quatre P-loop permet la haute sélectivité du canal pour le sodium. Le courant sodique cardiaque est un courant très rapide, de courte durée et de grande amplitude. Son activation permet une dépolarisation rapide de la membrane, celle-ci passant de -90mV à +20mV par l'entrée des ions positifs à l'intérieur du cytosol. La vitesse de dépolarisation du potentiel d'action dépend des canaux sodiques. Le courant sodique peut être régulé par différentes voies de signalisation.

Le canal sodique a trois états dans lequel il peut être ; l'état fermé, ouvert et inactivé. La figure 1.5.1 illustre les trois états du canal sodique cardiaque.

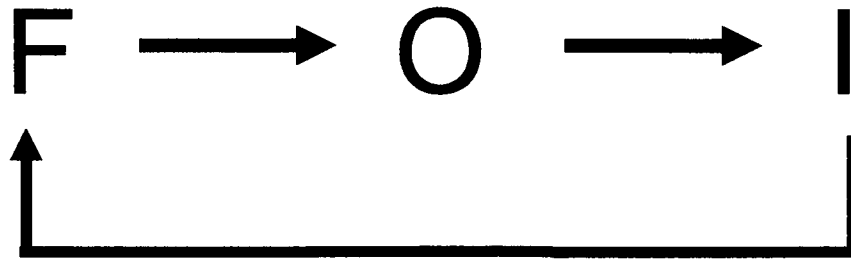


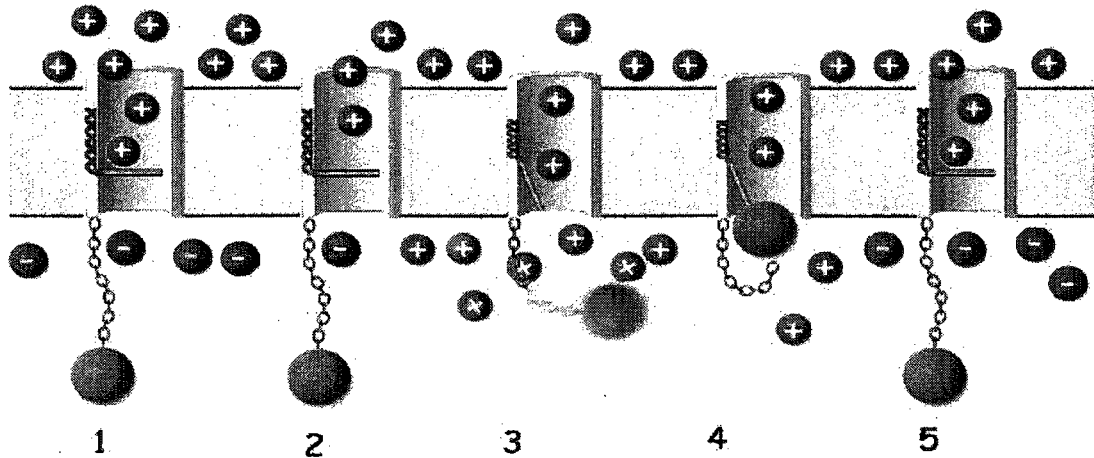
Figure 1.5.1 : Trois états de conformation du canal sodique cardiaque. F représente l'état fermé, O représente l'état ouvert et I représente l'état inactivé.

L'état fermé est observé lorsque le potentiel de membrane est à des potentiels hyperpolarisés, par exemple lorsque le myocyte est en période de repos à -90mV.

Comme le canal est voltage-dépendant, il s'ouvre suite à une dépolarisation membranaire. L'activation du canal est définie par Hodgkin-Huxley comme un processus rapide qui ouvre les canaux sodiques durant la dépolarisation membranaire (Hodgkin et Huxley. 1952a, b). Les segments transmembranaires S4 de chaque domaine seraient responsables de la dépendance du voltage pour l'ouverture des pores des canaux. En effet, les segments S4 possèdent huit acides aminés chargés positivement à tous les trois résidus dans la région transmembranaire (Hille. 1992). Cette configuration est généralement peu observée dans une région transmembranaire puisqu'il s'agit d'une région hydrophobe, et que les résidus hydrophobes ou non chargés se retrouvent généralement dans ces structures. Toutefois, selon les diverses théories, ces résidus agiraient comme des senseurs de voltage (Horn. 2005). Par analogie à la structure des canaux potassiques, ces segments chargés adoptent une configuration différente lors d'une dépolarisation et permettre l'ouverture du canal. Ainsi, lorsqu'une cellule adjacente transmet un courant

cationique non spécifique par les jonctions serrées à une cellule voisine, ce courant pénétrant dans la cellule crée une petite dépolarisation membranaire qui permet l'activation et l'ouverture des canaux sodiques cardiaques.

Une caractéristique importante de ce canal est qu'après son ouverture, celui-ci s'inactive de lui-même après une petite période de temps, de l'ordre de vingt millisecondes, si le voltage est maintenu. Toujours selon Hodgkin-Huxley, l'inactivation est un processus plus lent qui ferme les canaux pendant la dépolarisation (Hodgkin et Huxley. 1952a, b). Pour modifier cette conformation du canal, il faut absolument que la membrane soit repolarisée ou hyperpolarisée pendant plusieurs millisecondes. Cette inactivation a la propriété d'empêcher les canaux sodiques de se rouvrir après une première activation, menant ainsi à une perte d'excitabilité membranaire pendant et après le potentiel d'action. L'inactivation est souvent illustrée comme un processus de bouchon. Le pore est une ouverture dans la membrane et lorsqu'il est à l'état fermé, une porte d'activation dans le pore, schématisant les segments S4 empêche les ions de passer. Par contre, lorsque cette porte est ouverte, les ions positifs entrent dans la cellule et génèrent un courant. Par la suite, un déplacement d'une porte d'inactivation (bouchon) s'effectue pour aller fermer le pore du canal du côté intracellulaire, ce qui va empêcher de l'entrée des ions. C'est seulement lorsque la membrane retourne à l'état repolarisé que ce porte d'inactivation va libérer l'ouverture intracellulaire du pore. La figure 1.5.2 est une schématisation des processus d'activation et d'inactivation du canal sodique.



(Chadwick. 2007)

Figure 1.5.2 : Schématisation du processus d'activation et d'inactivation du canal sodique cardiaque. 1. Lorsque la membrane (jaune) est au repos, le canal est bloqué par la porte d'activation de la protéine. 2. Lorsque le canal sodique ressent un changement de voltage membranaire par une dépolarisation provenant des jonctions serrées adjacentes, les segments S4 du canal (hélice rouge) changent de conformation. 3. Ce changement permet l'ouverture de la porte d'activation, laissant entrer le sodium (charges positives rouges) à l'intérieur de la cellule par le canal sodique. Ce mouvement est poussé par la force électromotrice du sodium. 4. Comme la porte d'activation du canal ne peut se fermer pendant que la membrane est dépolarisée, la porte d'inactivation ferme le canal jusqu'à ce que le potentiel membranaire soit rétabli. Lorsque le potentiel est de retour à l'état de repos, la porte d'activation est fermée, la porte d'inactivation est retournée à sa configuration ouverte et le canal sodique est prêt à réagir à un autre stimulus.

L'inactivation du canal est très importante en physiologie cardiaque, car elle arrête la dépolarisation à un voltage environ 20mV. Si ce mécanisme n'était pas en place, le

potentiel membranaire demeurerait dépolarisé pendant une longue période de temps, et la repolarisation subséquente serait beaucoup plus longue ayant pour effet de prolonger la durée du potentiel d'action. Il est très important de noter que lorsque le canal est dans l'état inactivé, il ne peut pas se rouvrir, il doit absolument retourner à la configuration fermée. Ce processus est également voltage-dépendant. Le potentiel membranaire doit retourner à des potentiels très négatifs, proche du potentiel de repos membranaire, pour pouvoir retrouver sa configuration fermée.

Le temps de réactivation du canal sodique est défini comme le temps nécessaire au canal pour passer de la configuration inactivé à l'état fermé. La vitesse de ce processus est voltage-dépendante ; le potentiel membranaire doit retourner à des valeurs près du potentiel de repos pour enlever l'inactivation. Ceci peut prendre jusqu'à 100 ms afin que tous les canaux soient disponibles pour une activation subséquente. Ce temps de réactivation est directement relié à la période réfractaire cardiaque. Cette dernière est définie comme la période où l'excitabilité cellulaire est diminuée, étant donné que les canaux sodiques sont dans l'état inactivé. La période réfractaire absolue est définie comme la période où aucun stimulus, quelque soit son amplitude, peut produire un potentiel d'action. La période réfractaire relative est définie comme la période où une plus grande dépolarisation que la première est requise pour initier un autre potentiel d'action.

La période réfractaire est très importante en physiologie cardiaque. Elle assure d'une bonne relaxation musculaire afin d'empêcher un état de tétanie, état qui peut être atteint dans le muscle squelettique. La perte d'excitabilité pendant cette période est primordiale.

Sans celle-ci, une première cellule, qui vient de transmettre un potentiel d'action à une deuxième cellule, pourrait être re-stimulée par cette dernière avant même que la contraction de la première cellule soit terminée. Ceci amènerait une perte de synchronisation des cellules et causerait des problèmes de fibrillations ventriculaires. Ainsi, une diminution de la période réfractaire (une diminution du temps de réactivation des canaux) peut causer des arythmies cardiaques puisque les cellules sont trop rapidement excitables pendant ou après le potentiel d'action. Une augmentation du temps de réactivation induit l'effet contraire, soit une diminution du rythme cardiaque, puisque la période réfractaire est augmentée.

1.6. Objectifs

Le but de notre étude est de déterminer l'effet de l'apéline sur le courant sodique dans des myocytes provenant du ventricule gauche de chien. Basés sur les études publiées aux niveaux des effets diurétiques, vasculaires et cardiaques de l'apéline, nous proposons l'hypothèse suivante: l'effet inotrope positif de l'apéline est dû à une augmentation du courant sodique cardiaque. Une augmentation de celui-ci causerait une augmentation de la concentration de sodium intracellulaire. La relation entre un effet inotrope positif et une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium est largement démontrée dans la littérature (Alvarez et al. 1999 ; Bers et al. 2002 ; Mills et al. 2007).

Afin de tester cette hypothèse, nous proposons les objectifs spécifiques suivants :

- 1) Déterminer la présence et la localisation du récepteur APJ-R dans notre modèle animal canin.

- 2) Étudier l'effet de l'apéline sur le courant sodique des myocytes cardiaques.
- 3) Étudier les voies de signalisation de la protéine kinase A (PKA) et de la PKC afin de déterminer leur possible implication dans l'effet de l'apéline.

Afin de répondre à ces objectifs, nous allons utiliser des cardiomyocytes isolés du ventricule gauche de chien. Des techniques d'immunobuvardage, d'immunofluorescence et de patch clamp seront utilisées. L'apéline 13 et l'apéline 17 seront utilisées afin de déterminer s'il existe des différences physiologiques entre les deux formes. Enfin, les voies de signalisations seront étudiées par l'activation de la PKA et l'inhibition de la PKC lors des expériences de patch clamp.

Cette étude est primordiale pour l'avancement des connaissances en physiologie hormonale et cardiaque. En effet, l'apéline est une nouvelle hormone découverte il y a seulement dix ans. Il est important de connaître ses mécanismes d'action sur les cardiomyocytes afin de nous aider à comprendre son rôle au niveau du coeur. L'apéline est à ce jour l'agent endogène inotrope positif le plus puissant (Szokodi et al. 2002). Nous voulons connaître son mode d'action au niveau de courant sodique et des concentrations de calcium intracellulaire. Nos travaux pourraient aider à expliquer l'effet inotrope positif de l'apéline dont le mécanisme causatif demeure inconnu.

Les différentes études semblent indiquer que l'apéline aurait un potentiel thérapeutique dans plusieurs pathologies, dont l'hypertension, le diabète, l'obésité, l'ulcère, certaines maladies osseuses (Sorli et al. 2006). Il est important de connaître tous ses effets avant de pouvoir développer des agonistes du récepteur APJ-R pour le traitement de celles-ci.

De plus, l'apéline pourrait être utile dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, grâce à ses effets combinés inotrope positif, hypotenseur et diurétique.

2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES :

2.1 : Prélèvement du cœur de chien :

Toutes les expériences furent effectuées telles qu'approuvées par le Comité d'Éthique de l'Université de Sherbrooke selon le protocole 036-05 et en accord avec les lignes directrices du Conseil Canadien de la Protection des Animaux.

Solutions :

Solution de Krebs (en mM) : 100 Glutamate de potassium; 10 Aspartate de potassium; 25 KCl; 10 KH_2PO_4 ; 2 MgSO_4 ; 20 Taurine; 5 Creatine; 0,5 EGTA; 20 Glucose; 10 HEPES; 0,2% BSA. pH à 7.4 avec NaOH-HCl.

Protocole :

Des chiens bâtards mêlés labradors âgés de plus de 30 jours et ayant un poids entre 20 et 30 kg furent mis sous sédation par une injection intramusculaire d'un mélange de 0,25 mg/kg d'Atravet (Wyeth Pharmaceutiques, Markham, Ontario) et de 5000 U d'héparine sodique (LEO Pharma Inc., Thornhill, Ontario). Après 15 à 20 minutes, les chiens furent anesthésiés par une injection IV de 25 mg/kg de sodium pentobarbital (Bimeda-MTC Animal Health Care, Cambridge, Ontario) mélangée avec 5000 U d'héparine sodique (LEO Pharma Inc., Thornhill, Ontario). Lors de la perte de réflexe oculaire de l'animal, la cage thoracique fut ouverte entre la quatrième et cinquième côte du côté gauche. Le cœur

toujours battant fut retiré de l'enveloppe du péricarde. L'aorte et le tronc pulmonaire furent coupés et le cœur extrait fut préservé dans une solution de Krebs à 4°C.

2.2 : Immunobuvardage :

Solutions :

Solution A 10 % Gel séparateur SDS-PAGE : 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8; 0,1% de SDS; 10% d'acrylamide/bis; 0,2% d'ammonium persulfate; 0,2% (v/v) de TEMED.

Solution B 4 % Gel concentrateur SDS-PAGE : 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de SDS; 4% (v/v) d'acrylamide/bis; 0,2% d'ammonium persulfate; 0,2% (v/v) de TEMED.

Solution d'échantillon 2X : 20% (v/v) de Glycérol; 10% (v/v) de β -mercatoethanol; 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8; 4% de SDS; 0.004% de bromophenol blue.

Solution de Migration : 25 mM de Tris-Base; 190 mM de Glycine; 3,5 mM de SDS; pH à 8,3.

Solution de Transfert : 25 mM de Tris-Base; 190 mM de Glycine.

Solution de Lavage : 20 mM de Tris-Base; 0,5 M NaCl, 0,1% (v/v) de Tween-20; pH à 7,4.

Solution de Blocage : 20% (v/v) de Solution de Transfert sans Tween-20; 5% (v/v) de sérum; 5% (g/v) de lait en poudre non écrémé; 0,05% (v/v) de Tween-20; 10% (v/v) de sérum de chèvre (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario); pH 7,4 avec NaOH.

Solution d'anticorps primaire: Solution de Blocage contenant une concentration 1 :2000 d'anticorps Anti-APJ-R de (Neuromics Antibodies, Edina, Minnesota).

Solution d'anticorps secondaire: Solution de Blocage contenant une concentration 1 :3000 d'anticorps Chèvre Anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (H+L)-HRP (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario).

Protocole :

Les protéines du coeur de chien furent extraites à partir d'un homogénat du ventricule gauche et les protéines du cerveau de rat furent extraites d'un homogénat de cerveau de rat. Une quantité de 70 µg de protéines fut mélangée à la Solution d'échantillon 2X. Le mélange fut chauffé à 60°C pendant 10 minutes et par la suite déposé dans les puits d'un gel SDS-PAGE (4% concentrateur/10% séparateur) préalablement remplis avec la Solution de Migration pour faciliter le dépôt. Le gel migrât pendant environ 4h30 à 20 mA par gel dans la Solution de Migration. Les protéines furent par la suite transférées dans la Solution de Transfert sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) (préalablement activée au méthanol) à 4°C. La membrane contenant les protéines fut par la suite incubée dans la Solution de Blocage pendant 2 heures, à température pièce, sur une plaque agitatrice. La membrane

fut ensuite incubée pendant une heure à la température de la pièce avec l'anticorps primaire contre le récepteur APJ-R sur une plaque agitatrice. Par la suite, la membrane fut lavée avec la Solution de Lavage, 5 fois, pendant 5 minutes. La membrane fut par la suite incubée en présence de l'anticorps secondaire Anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase pendant 2 heures. Finalement, les complexes immuns furent détectés à partir du réactif Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer LAS, Inc., Boston, Massachusetts). La chemiluminescence fut par la suite visualisée par l'exposition de la membrane sur des films Blue XB-1 (Kodak, Cedex, France).

2.3 : Isolation cellulaire :

Solutions :

Solution de Tyrode (en mM) : 126 NaCl; 5,4 KCl; 5 MgCl₂; 1 NaH₂PO₄; 22 Glucose; 24 HEPES; 20 Taurine; 5 Créatine; 5 Pyruvate de sodium. pH à 7.4 avec NaOH. Oxygénée pendant une heure à 37°C.

Solution de Tyrode/BDM : Solution de Tyrode avec 28 mM de 2,3 Butanedione monoxime.

Solution 1 : Solution de Tyrode/BDM contenant 2 mM d'EGTA.

Solution 2 : Solution de Tyrode/BDM contenant 46 300 U de collagénase (Worthington Biochemical Corporation, Hornby, Ontario) et 0,1mM de CaCl₂.

Solution 3 : Solution de Tyrode/BDM contenant 0,1 mM de CaCl_2 .

Solution de Krebs (en mM) : 100 Glutamate de potassium; 10 Aspartate de potassium; 25 KCl; 10 KH_2PO_4 ; 2 MgSO_4 ; 20 Taurine; 5 Creatine; 0,5 EGTA; 20 Glucose; 10 HEPES; 0,2% BSA. pH à 7.4 avec NaOH-HCl.

Protocole :

Un bloc du ventricule gauche perfusé par l'artère coronaire antérieure gauche fut excisé du cœur. Ce bloc fut par la suite canulé par cette artère avec une aiguille 18 G (ou 20 G) et cette dernière fut maintenue en place par des pinces et du fil chirurgical. L'artère, ainsi que toutes les autres fuites potentielles, furent bouchées par des pinces afin de permettre une perfusion complète du tissu à un rythme de 4 à 6 ml/min. Le bloc fut par la suite installé dans un système de perfusion (température à 33°C) qui permet un rythme d'écoulement des différentes solutions de 5 ml/min. Un premier lavage du tissu (5 minutes) fut effectué avec la Solution 1 contenant de l'EGTA 2 mM afin de chélater le calcium extracellulaire. Le bloc fut ensuite perfusé avec la Solution 2 contenant la collagénase pendant 25 à 45 minutes, ce qui permettait la digestion du tissu conjonctif. Le tissu fut considéré suffisamment digéré lorsque nous observions des cellules individuelles se détacher d'un petit morceau de tissu prélevé sur le bloc. À cette étape, le bloc fut enlevé du système de perfusion. Trois différentes sections du tissu, l'épicarde, le midmyocarde et l'endocarde furent disséquées. Chaque partie fut émincée puis mise dans un bécher contenant un mélange 1 :1 de Solution 2 et 3 sous faible agitation. Les cellules

séparées et maintenues en suspension dans la solution furent alors récoltées aux 5 minutes (entre 4 et 5 différentes fractions). Cette suspension cellulaire fut filtrée à l'aide d'un coton filtre placé à l'ouverture des tubes dans lesquels les cellules étaient récoltées. Cette étape permettait d'empêcher les gros amas cellulaires non digérés d'être récoltés. Après la précipitation des cellules, un premier lavage avec la Solution 3 fut effectué. Le lavage fut répété 2 autres fois. Ceci permettait d'enlever toutes les traces de collagénase dans les suspensions cellulaires afin de s'assurer de l'arrêt de la digestion cellulaire. Les cellules furent ensuite resuspendues dans la Solution de Krebs contenant 0,2 mM de CaCl_2 et furent mises à 4°C pendant une période minimale de 4 heures.

2.4 : Immunofluorescence :

Solutions :

Solution de Percoll : 4,23 ml de Percoll; 0,47 ml de Saline 9% et 1 goutte d'acide acétique 1N.

Solution de Tyrode (en mM) : 126 NaCl; 5,4 KCl; 5 MgCl_2 ; 1 NaH_2PO_4 ; 22 Glucose; 24 HEPES; 20 Taurine; 5 Créatine; 5 Pyruvate de sodium. pH à 7.4 avec NaOH.

Solution de Sucrose : Solution de Tyrode contenant 25% de sucrose.

Solution A : Solution de Tyrode contenant 5 mM de caféine et 0,1 mM de CaCl_2 .

Solution B : Solution de Tyrode contenant 0,5% de CHAPS et 0,25% de Saponin.

Solution C : Solution de Tyrode à pH 4,00 avec HCl.

Solution de Formaldéhyde : 10% (v/v) de Formaldéhyde et 6 mM d'acétate de zinc.

Solution de Fixation (v/v) : 70% de Solution de Formaldéhyde; 25% d'acétone; 5% d'éthanol 100%.

Solution Anticorps primaire : Solution Tyrode contenant 10% de sérum de singe (Wistent Inc, St-Bruno, Québec) et une concentration 1 :100 d'anticorps Anti-APJ-R (SantaCruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, Californie).

Solution Anticorps secondaire: Solution Tyrode contenant 10% de sérum de singe (Wistent Inc, St-Bruno, Québec) et une concentration 1 :1000 d'anticorps Anti-IgG de chèvre conjugué à la sonde fluorescence Alexa fluor 488 (SantaCruz Biotechnology, Inc., SantaCruz, Californie).

Protocole :

Tout le protocole fut fait sur glace bleue à 4°C. Les cellules fraîchement isolées provenant du midmyocarde furent utilisées après deux heures d'acclimatation à la Solution de Krebs à 4°C. Les cellules furent purifiées à l'aide d'une Solution de Percoll afin d'éliminer les cellules mortes et les nombreux débris cellulaires. Un volume de 5,3 ml de la suspension

cellulaire fut ajouté à la Solution de Percoll et le tout fut doucement mélangé par inversion. Le mélange fut centrifugé à 4 °C pendant 8 minutes à 700 g. Le surnageant fut aspiré et jeté. Les cellules précipitées furent resuspendues dans une solution froide de Krebs contenant 0,2 mM de CaCl₂.

Une fois que les cellules furent bien précipitées par gravité à nouveau au fond du tube, le surnageant fut aspiré pour laisser les cellules dans un volume final d'environ 0,9 ml. La Solution A à 4°C fut ajoutée doucement aux cellules selon le tableau suivant (Tableau 2.4.1) à des intervalles de 8 minutes. Le tube fut inversé tranquillement entre toutes les dilutions pour permettre de resuspendre les cellules dans la nouvelle dilution de Solution A. Cette dernière permettait une acclimatation lente des cellules à la caféine. La caféine fut utilisée afin de vider les réservoirs intracellulaires de calcium des organelles myocytaires. Les cellules déprimées de calcium avait une meilleure capacité à résister à l'étape de centrifugation et à conserver leur structure cellulaire.

Tableau 2.4.1: Dilution de Solution A pour l'acclimatation à la caféine des cellules.					
Concentration finale (v/v)	0,10	0,15	0,20	0,50	0,70
Volume de Solution A à ajouter (ml)	0,10	0,18	0,29	1,47	6,86
Volume Final (ml)	1,00	1,18	1,47	2,94	9,80

Tableau 2.4.1 : Dilution de Solution A pour l'acclimatation des cellules à la caféine. v/v = rapport volume/volume.

Une fois la dernière dilution terminée, le surnageant fut jeté et les cellules furent resuspendues dans 10 ml de Solution A. Le culot cellulaire fut lavé 2 fois avec la

Solution A à des intervalles de 5 minutes. Un décompte cellulaire fut effectué et les cellules furent resuspendues dans le volume approprié pour obtenir une concentration d'environ $2,4 \times 10^4$ cellules/ml.

Les chambres du Cytospin furent par la suite préparées afin de déposer les myocytes à un endroit spécifique sur des lames de verres à l'aide de cuvettes lors de la centrifugation. Les lames de verres HistoBond (Raymond A Lamb, UK) furent identifiées et mises dans les chambres à Cytospin avec les cuvettes réutilisables. Dans chaque cuvette, 200 μ l de Solution Krebs contenant 25% de sucrose furent déposés. Ce gradient de sucrose permettait un dépôt cellulaire plus diffus sur la lame, et donc, une meilleure préservation de la structure cellulaire. Immédiatement après, 100 μ l de la suspension cellulaire furent déposés doucement dans les cuvettes avec une pipette ayant un embout coupé pour éviter d'endommager les cellules. Les cellules furent centrifugées dans le Cytospin (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) à 400 RPM pendant 2 minutes. Après centrifugation, les lames furent immédiatement transférées dans des vases de Coplin sur glace contenant la Solution de Fixation. Les cellules furent fixées sur les lames pendant 15 minutes, puis rincées avec la Solution C, deux fois, pendant 1 minute, afin d'enlever les sels de zinc. Les cellules furent par la suite perméabilisées avec la Solution B, 3 fois, pendant 5 minutes. Ceci permettait à l'anticorps, qui liait la partie intracellulaire du récepteur APJ-R, de pénétrer la membrane cellulaire.

La Solution d'anticorps primaire fut appliquée sur les lames installées dans une chambre humide toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules furent lavées avec la Solution de Tyrode, 3 fois, pendant 5 minutes. L'anticorps secondaire fut ensuite appliqué avec la

Solution Anticorps secondaire pendant 3 heures à température pièce dans une chambre humide. Les lames furent par la suite lavées pendant 2 minutes à 3 reprises avec de l'eau Nanopure filtrée. Une goutte de solution Antifade (Invitrogen, Eugene, Oregon) fut déposée au centre des cellules afin de préserver la fluorescence de la sonde Alexa fluor 488 couplé à l'anticorps secondaire. Une petite lamelle (VWR International, USA) est déposée par la suite sur le dessus des cellules pour conserver l'intégrité de l'anticorps.

2.5 : Mesures électrophysiologiques :

Principe du patch-clamp :

Il est possible de mesurer les divers courants présents dans les cellules, dont le courant sodique, à l'aide de la technique du patch clamp. Cette technique permet l'enregistrement des courants, ou encore du potentiel membranaire, à l'aide d'une électrode. Le patch clamp est divisé en deux techniques distinctes ; le voltage imposé et le courant imposé. Le courant imposé consiste à injecter une quantité de courant désirée à l'intérieur d'une cellule et de mesurer les variations du potentiel membranaire induites. Le voltage imposé est la technique inverse qui consiste à induire un potentiel membranaire précis et de mesurer le courant qui est généré par la cellule. Pour ces expériences, le voltage imposé fut utilisé.

Le courant associé au voltage peut être mesuré selon plusieurs méthodes. La configuration utilisée pour nos expériences fut la configuration cellule entière, aussi connue sous le nom « whole-cell ». Elle permet de mesurer le courant total généré par la

cellule. Elle est obtenue par le bris de la membrane sarcoplasmique au niveau de l'ouverture de la pipette. L'intérieur de la pipette simule le milieu intracellulaire. La solution de perfusion mime le milieu extracellulaire et est facilement modifiable durant les enregistrements.

Solutions :

Solution extracellulaire Contrôle (en mM) : 120 Choline-Cl; 5 NaOH; 5 NaCl; 4 KOH; 2,8 Na-Acétate; 0,5 CaCl₂; 1,5 MgCl₂; 10 HEPES; 1 CoCl₂; 5 TEA; 2 4-AP; 5 BaCl₂; 10 Glucose. pH à 7,4 avec NaOH-HCl. Osmolarité ajusté à 300 mOsm avec sucrose.

Solution extracellulaire supplémentée d'IBMX et de 8-bromo-AMPC (en mM) : 120 Choline-Cl; 5 NaOH; 4 KOH; 2,8 Na-Acétate; 0,5 CaCl₂; 1,5 MgCl₂; 20 HEPES; 1 CoCl₂; 5 TEA; 2 4-AP; 5 BaCl₂; 10 Glucose; 100 IBMX; 0,005 8-bromo-AMPC. pH à 7,4 avec CsOH-HCl. Osmolarité ajusté à 300 mOsm avec sucrose.

Solution extracellulaire supplémentée de Chelerytrine (en mM) : 120 Choline-Cl; 2,2 NaOH; 4 KOH; 2,8 Na-Acétate; 0,5 CaCl₂; 1,5 MgCl₂; 20 HEPES; 1 CoCl₂; 5 TEA; 2 4-AP; 5 BaCl₂; 10 Glucose; 0,003 Chelerytrine. pH à 7,4 avec CsOH-HCl. Osmolarité ajusté à 300 mOsm avec sucrose.

Solution intracellulaire (en mM) : 15 NaCl; 120 CsF; 5 KCl; 1 MgCl₂; 10 EGTA; 20 HEPES; 4 Na₂-ATP. pH à 7,3 avec CsOH. Osmolarité ajusté à 295 mOsm avec sucrose.

Solution d'apéline 13 : 100 μ M d'apéline 13 (Laboratoire de Dr Neugebauer, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec) dissout dans du PBS à pH 7,4.

Solution d'apéline 17 : 100 μ M d'apéline 17 (Laboratoire de Dr Neugebauer, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec) dissout dans du PBS à pH 7,4.

Montage :

Le montage de patch-clamp fut composé d'un microscope Olympus (Olympus, Markham, Ontario) où une platine mobile fut installée afin de permettre le déplacement d'un pétri de 35 mm dans l'axe des X et des Y. Un micromanipulateur (SD Instruments, San Diego, Californie) fut installé sur le microscope afin de permettre le déplacement de la pipette d'enregistrement dans le pétri. La pipette d'enregistrement fut reliée à la tête CV-201A de l'amplificateur (Axon Instruments, Union City, CA). Le signal fut amplifié avec l'amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA), digitalisé par le digitizer 1440A Axon (Axon Instruments, Union City, CA), transmis à l'ordinateur et visualisé par le programme pCLAMP 10,0 (Axon Instruments, Union City, CA). Une mise à la terre fut installée dans le pétri afin d'obtenir une valeur de référence de zéro courant. Le microscope, le bain, le micromanipulateur et la tête de l'amplificateur furent installés dans une cage de Faraday afin d'éviter que des courants ambiants, ne soient enregistrés.

Protocole :

Toutes les mesures électrophysiologiques furent effectuées à température pièce (22°C). Les myocytes isolés furent resuspendus dans la solution de Krebs avec calcium et quelques gouttes furent déposées dans les pétris de type Cell+ (Sarstedt Inc, Montréal, Québec) dans le montage de patch clamp. Lorsque les cellules étaient adhérentes au fond du pétri (environ 3 minutes) elles furent lavées avec la Solution extracellulaire à une vitesse de perfusion de 2ml/minutes. Cette solution contenait des inhibiteurs de canaux ioniques pour bloquer les courants ioniques non étudiés dans cette étude. Le TEA, le cobalt, le barium, et le 4-AP furent utilisés pour bloquer le courant potassique TEA-sensible, le courant calcique, le courant I_{K1} et le courant I_{to} respectivement. Également, cette solution contenait une faible concentration en sodium, comparativement au milieu extracellulaire physiologique. Une faible concentration extracellulaire de sodium affecte directement le potentiel d'inversion du sodium (E_{Na}) comparativement aux conditions physiologiques puisque ce dernier est fonction du rapport de la concentration de sodium de part et d'autre de la membrane. Un déplacement du potentiel d'inversion vers des potentiels plus négatifs induit une diminution du courant sodique qui ce dernier est plus facile à mesurer et qui permet un meilleur contrôle sur le voltage lors des mesures. Malgré cette modification de concentrations de sodium comparativement aux conditions physiologiques, puisque toutes les expériences furent faites avec la même concentration de sodium selon les différentes conditions évaluées, les résultats sont comparables entre eux.

Les pipettes de verre en borosilicate (7052) (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Floride) utilisées pour le patch furent étirées par l'étireuse Modèle PP-89 (Narashige, Japon) afin d'avoir une résistance entre 2-3 M Ω une fois polies avec une microforge MF

830 (Narashige, Japon). Une fois remplie avec la Solution intracellulaire, la pipette fut installée sur la tête de l'amplificateur et le fil d'argent chloruré fut mis en contact avec la Solution intracellulaire ce qui permettait l'enregistrement des signaux. Lorsqu'une cellule était centrée dans l'objectif 40X du microscope, la pipette fut tranquillement approchée à l'aide du micromanipulateur et centrée sur le myocyte. L'approche de la pipette se faisait avec une faible pression positive. Lorsque la résistance augmentait de 3 à 4 fois, la descente à l'aide du micromanipulateur sur la cellule fut alors arrêtée. Le protocole utilisé pour l'approche consistait à un saut de 5 mV à partir d'un potentiel de maintien de 0 mV pendant 10 ms et ce, à une fréquence de 100 Hz. Une jonction étanche (seal) fût par la suite obtenue entre la pipette de verre et la cellule de l'ordre du Giga Ω . Si elle ne s'obtenait après 5 minutes, une faible pression négative pouvait être effectuée afin de faciliter la jonction étanche. Une ou deux minutes après l'obtention de celle-ci, la membrane fut percée par une petite aspiration soudaine ou encore à l'aide de l'injection d'un faible courant électrique. Après un temps d'attente d'environ 8 minutes qui permettait la diffusion entre le milieu intracellulaire de la cellule et la solution intracellulaire de la pipette et la stabilisation de la jonction serrée, les protocoles d'électrophysiologie pouvaient être commencés. L'apéline 13 ou 17 furent perfusées à une concentration de 100 nM sur les myocytes pendant une période variant entre 15 et 20 minutes avant la mesure des courants, temps où l'effet de l'apéline était maximal. La solution extracellulaire supplémentée d'IBMX et de 8-bromo-AMPC fut appliquée en perfusion 20 minutes avant la prise des mesures. La solution extracellulaire supplémentée de Chelerythrine fut appliquée en perfusion 30 minutes sur les myocytes avant les mesures du courant sodique.

Protocoles et analyses d'électrophysiologie :

Capacitance de la membrane : Le potentiel de maintien de la membrane fut de 0mV et une seule dépolarisation de +10 mV pendant 30 ms fut effectuée. Figure 2.5.2 représente le protocole de la capacitance et un exemple du courant mesuré par ce dernier. La section hachurée représente l'aire sous la courbe calculée.

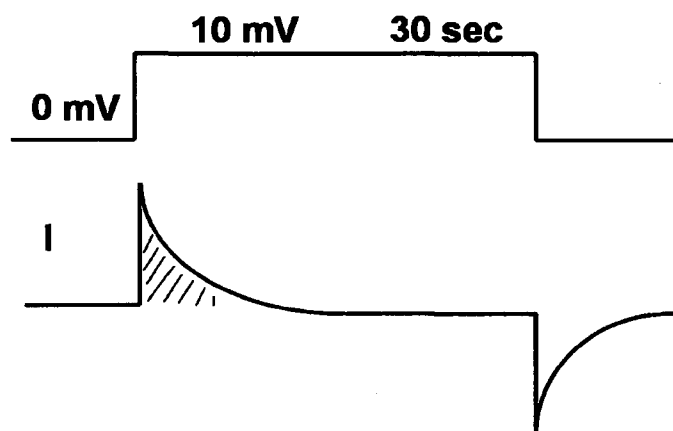


Figure 2.5.1 : Protocole de la capacitance de la cellule et tracé théorique de la mesure du courant capacitif en fonction du temps.

Comme $I = C \, dV/dt$, la capacitance de la cellule est représentée par $C = (1/\Delta V) \int I dt$, où C représente la capacitance, ΔV la différence de potentiel entre les deux potentiels, et $\int I dt$ l'intégrale du courant I en fonction du temps, soit l'aire sous la courbe. Dans le programme Clampfit (Axon Instruments, Union City, CA), l'aire sous la courbe fut mesurée à partir du début du saut de voltage jusqu'à 30 ms, là où le courant capacitif fut retourné à 0 pA. Cette valeur fut par la suite divisée par le ΔV (10 mV) pour obtenir la valeur de la capacitance de la cellule en pF.

Courbe relation Courant-Voltage (I/V) : Le potentiel de maintien de la membrane fut de -120 mV. Vingt-deux dépolarisations débutant à -80 mV avec des augmentations de 5 mV à chaque saut furent faites pendant 25 ms. Le potentiel retournait au potentiel de maintien entre chaque saut de dépolarisation. Les différentes dépolarisations furent espacées de 2 secondes. Figure 2.6.3 représente le protocole I/V et où F, O et I représente les états fermé, ouvert et inactivé des canaux sodiques.

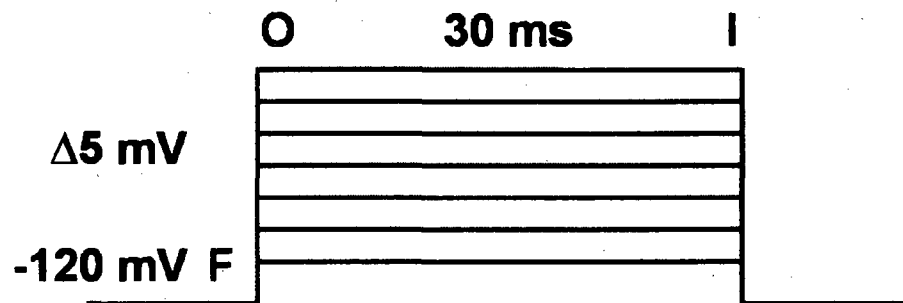


Figure 2.5.2 : Protocole de la courbe I/V.

Dans le programme Clampfit, le courant pic I_{Na} de chaque voltage fut mesuré. I_{Na} fut mis en relation avec le voltage associé. I_{Na} fut par la suite divisée par la capacitance C de la cellule. Ainsi, une densité de courant en fonction du voltage fut obtenue. Un exemple théorique de cette courbe I_{Na} en fonction du voltage (I/V) est représenté à la Figure 2.5.4, où I_{Max} représente le courant maximal de la courbe I/V, E_{Na} le potentiel d'inversion du sodium et G_{Max} la conductance maximale du canal.

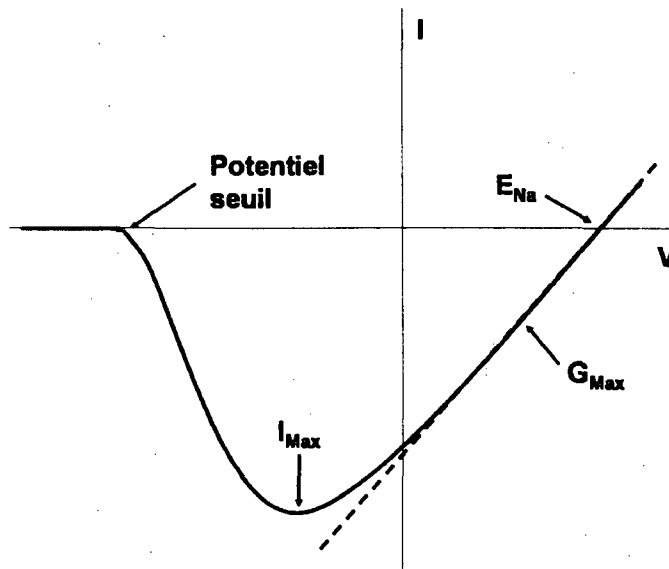


Figure 2.5.3 : Courbe I/V théorique. I_{Max} = courant maximal de la courbe I/V, E_{Na} = potentiel d'inversion du sodium, G_{Max} = la conductance maximale du canal, I = courant (pA/PF), V = voltage (mV).

Le courant est exprimé de la façon suivante : $I_{Na} = G_{Na} (V_m - E_{Na})$ où I_{Na} représente le courant mesuré et G_{Na} la conductance du canal. Le E_{Na} est le voltage qu'il faut appliquer à travers la membrane pour qu'aucun courant sodique de part et d'autre de la membrane ne soit observé. Il dépend des différentes concentrations intracellulaires et extracellulaires de sodium dans le système étudié. Il se calcule théoriquement par cette équation de Nerst : $E_{Na} = (RT/F) \ln ([Na]_o / [Na]_i)$ où R est la constante des gaz, T est la température en Kelvin, F est la constante de Faraday et $[Na]_o / [Na]_i$ est le rapport des concentrations extracellulaire et intracellulaire de sodium (Hille. 1992). Cette valeur se mesure aussi expérimentalement, en déterminant le voltage où I_{Na} est égale à 0. Par la dépolarisation subséquente de la cellule par voltage clamp, nous pouvons obtenir le E_{Na} en observant le voltage auquel le courant mesuré est nul ; ni entrant, ni sortant.

Lors de ce protocole I/V, nous contrôlons V_m et mesurons I_{Na} . En présence de ces trois paramètres (V_m , I_{Na} et E_{Na}), il est possible de déterminer expérimentalement la conductance macroscopique de la population des canaux (G_{Na}) en fonction du voltage. Le G_{Na} est un paramètre mathématique qui représente l'activation du canal en fonction du voltage. En effet, la conductance est électriquement définie comme l'inverse de la résistance, soit la capacité du canal à laisser passer les ions. Si elle est nulle, cela signifie que le canal est fermé et aucun ion sodique ne peut passer. Lorsque la conductance atteint G_{Max} , cela signifie qu'un maximum de canaux est ouvert. Ainsi, la valeur maximale de G_{Na} (G_{Max}) représente l'activation du canal en fonction du voltage. Ces paramètres nous ont permis de calculer l'activation des canaux en fonction du voltage et obtenir ainsi une courbe d'activation du canal sodique.

Courbe d'activation : L'équation de la partie linéaire de chaque courbe I/V représente G_{Max} et fut déterminée par régression linéaire. La G_{Max} et le E_{Na} de la courbe fut déterminée par l'équation de la régression linéaire $I_{Na} = G_{Max}V_m + E_{Na}$. La G_{Na} en fonction de V_m fut alors déterminé par cette formule : $I_{Na} / (V_m - E_{Na})$. L'activation du canal sodique en fonction de V_m fut par la suite obtenue en normalisant la valeur G_{Na} de chaque voltage à G_{Max} . Donc, la courbe d'activation fut balisée entre les valeurs de 0 à 1 où ce dernier représentait l'activation maximale du canal sodique en fonction du voltage. Un lissage de cette courbe fut effectué par le programme Origin avec l'équation de Boltzmann; $G_{Na} = A_1 - A_2 / (1 + e^{(V-V_{1/2})/k}) + A_2$ où G_{Na} est l'activation du canal, $V_{1/2}$ est voltage où l'activation est de 50%, et k est la valeur de la pente.

Courbe d'inactivation (h_{∞}) : Le potentiel de maintien de la membrane fut de -120 mV. Vingt-deux dépolarisations de conditionnement (Pc) d'une durée de 500 ms débutant à -140 mV avec des sauts séquentiels et cumulatifs de 5 mV furent appliquées. Ces Pc induisent une partie des canaux sodiques à passer de l'état fermé à inactivé dépendamment du voltage. Par la suite, une dépolarisation de 50ms à un potentiel test (Pt) de -15 mV de 50 ms fut appliquée et suivie d'un retour au potentiel de maintien. Les canaux qui sont inactivés lors du potentiel de conditionnement n'étaient plus disponibles pour l'ouverture. Les dépolarisations furent espacées de 10 secondes. Figure 2.5.5 schématise le protocole et F, O, I représente les états fermé, ouvert et inactivé des canaux sodiques.

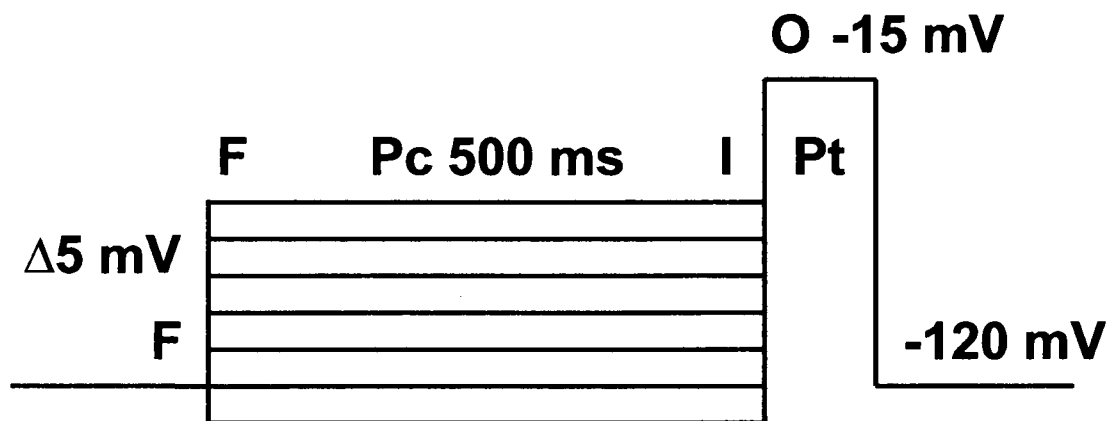


Figure 2.5.4 : Protocole d'inactivation. Pc = potentiel de conditionnement, Pt = potentiel test.

Dans Clampfit, le courant pic I_{Na} de Pt à -15mV fut mesuré pour chaque tracé. Il fut ensuite mis en relation avec Pc. I_{Na} fut par la suite normalisée au courant maximal I_{Max} obtenu. Une courbe d'inactivation en fonction du voltage fut ainsi obtenue avec des valeurs variant de 1 à 0 où 1 représentait la disponibilité maximale des canaux. Un lissage

de cette courbe fut effectué avec l'équation de Boltzmann; $I / I_{\text{Max}} = A_1 - A_2 / (1 + e^{(V - V_{1/2})/k}) + A_2$ où I / I_{Max} représente la disponibilité du canal, $V_{1/2}$, voltage où l'inactivation est de 50%, et k , la valeur de la pente.

La superposition des courbes d'activation et d'inactivation présente une zone d'intersection et de recouvrement. Cette région représente une zone où les canaux sont en équilibre instable entre l'état ouvert et inactivé. L'aire sous la courbe de cette fenêtre fut calculée dans ORIGIN pour chaque condition et fut normalisé en pourcentage par rapport à l'aire de la condition contrôle.

Les lissages des courbes d'activation et d'inactivation furent utilisés pour déterminer le courant de fenêtre $I_{f_{\text{Na}}}$. Ce dernier fut déterminé par l'équation $I_{f_{\text{Na}}} = G_{\text{Max}} m^3 h (V_m - E_{\text{Na}})$ où m est l'activation du canal sodique et h est son inactivation. Les facteurs m et h furent déterminés mathématiquement par les équations de Boltzmann des courbes d'activation et d'inactivation obtenues expérimentalement. L'intégrale de $I_{f_{\text{Na}}}$ fut calculée dans ORIGIN et normalisée en pourcentage par rapport à la condition contrôle.

Courbe de réactivation : Le potentiel de maintien de la membrane fut de -100mV. Un premier saut de conditionnement S_1 à -15mV pendant 20ms fut appliqué. Les canaux passaient de l'état fermé à ouvert, et s'inactivaient par eux même en fonction du temps. Un deuxième saut test S_2 à -15mv fut effectué à différents intervalles de 2 ms pendant 41 tracés. La fraction des canaux qui étaient retournés à l'état fermé entre les deux sauts fut disponible pour l'ouverture lors de S_2 . Les différents enregistrements furent espacés de 2

s. Figure 2.5.6 schématise le protocole de réactivation et F, O, I représente les états fermé, ouvert et inactivé des canaux sodiques.

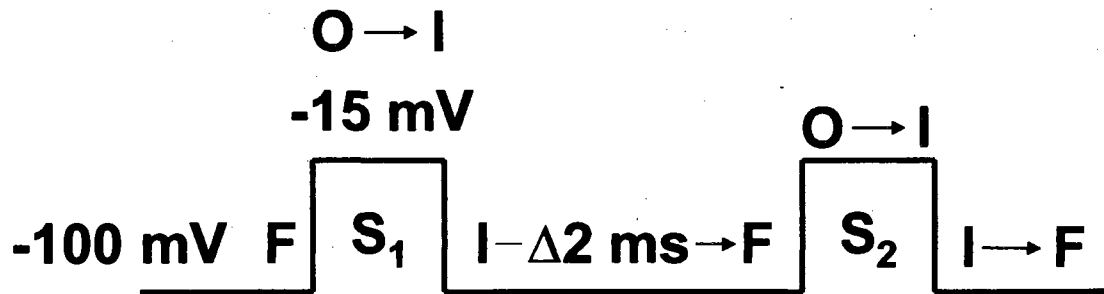


Figure 2.5.5 : Protocole de la réactivation du canal. S₁ = premier saut de potentiel, S₂ = deuxième saut de potentiel.

Le courant pic (I_{Na}) de S₁ et de S₂ furent mesurés pour chaque tracé et mis en relation avec l'intervalle de temps entre les deux sauts de potentiel. L'amplitude de I_{NaS_2} fut par la suite divisée par l'amplitude de I_{NaS_1} . Ainsi, la courbe de réactivation fut obtenue en fonction de temps d'intervalle entre les deux sauts avec des valeurs variant de 0 à 1 où ce dernier représentait une réactivation maximale du courant. Un lissage fut effectué avec l'équation $I_{S2}/I_{S1} = (I_{S2}/I_{S1})_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$ où I_{S2}/I_{S1} était la fraction récupérable, $(I_{S2}/I_{S1})_0$ la fraction récupérable au temps 0 et t le temps d'intervalle entre les deux sauts.

2.6 : Statistiques :

Les données furent présentées comme la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Le t-test de Student fut utilisé pour déterminer les différences significatives entre les courants maximaux et les transitoires calciques des différentes conditions. Pour les

courbes d'activation, d'inactivation et de réactivation, les comparaisons de lissage furent effectuées dans ORIGIN pour déterminer les significativités des différences. Un $p < 0,05$ fut considéré comme une différence statistiquement significative.

3. RÉSULTATS :

3.1 : Détection du récepteur APJ-R par Immunobuvardage.

Le but de ces expériences était de confirmer la présence du récepteur de l'apéline au niveau du ventricule gauche du chien. Sa présence a été décrite dans la littérature au niveau de ce tissu, mais il s'agissait de la première fois dans un modèle canin. Un extrait protéique du ventricule gauche de chien fut migré sur gel de poly-acrylamide et la protéine fut détectée par un anticorps spécifique qui détecte un épitope du récepteur APJ-R. L'anticorps fut dirigé vers le récepteur APJ-R de rat, mais puisque la séquence protéique de l'épitope était la même chez le chien, il pouvait être utilisé dans notre expérience.

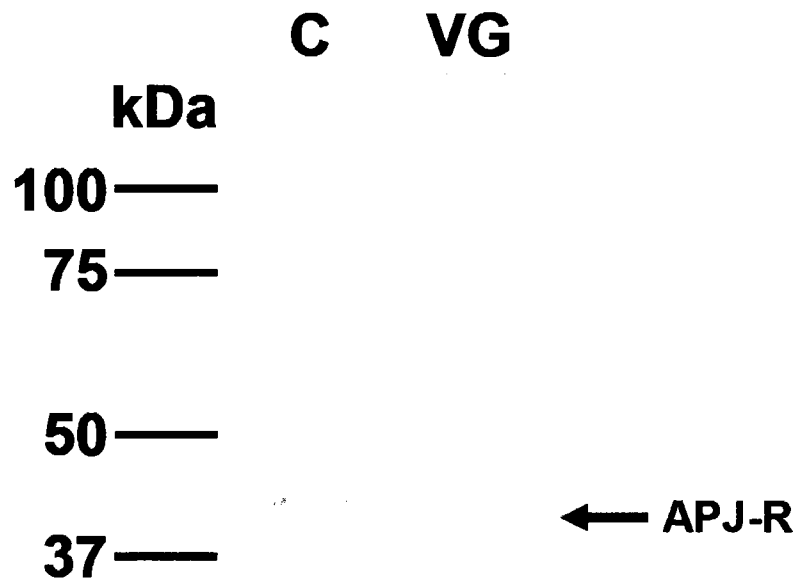


Figure 3.1.1 : Présence du récepteur APJ-R au niveau d'un extrait protéique du cerveau de rat et du ventricule gauche du chien. Détection protéique du récepteur APJ-R au niveau

du cerveau de rat (C) et du ventricule gauche de chien (VG) en fonction du poids moléculaire en kiloDalton (kDa).

Un extrait protéique de cerveau de rat fut utilisé comme contrôle positif puisqu'il était largement démontré dans la littérature qu'il se situait à 42 kDa, tel qu'obtenu sur notre gel. Dans notre extrait protéique provenant du ventricule gauche de chien, nous avons observé une bande également à 42 kDa tel qu'attendu. Nous avons observé aussi qu'il y a deux autres bandes sur le gel à environ 80 et 160 kDa. Les expériences effectuées avec le peptide contrôle ont permis de démontrer que l'anticorps était spécifique à la protéine APJ-R puisque les bandes observées disparaissaient lorsque l'anticorps était préabsorbé (résultats non illustrés). Les expériences d'immunobuvardage nous ont permis de déterminer que le récepteur est bien présent dans notre tissu d'intérêt. Toutefois, la localisation était toujours inconnue et nous avons entrepris de le localiser au niveau cellulaire.

3.2 Localisation du récepteur APJ-R sur des myocytes par Immunofluorescence.

L'objectif de l'immunofluorescence était de localiser le récepteur APJ-R au niveau des myocytes isolées du ventricule gauche. La détermination de son emplacement permettait de renforcer hypothèse de sa fonction cellulaire. Sa détection fut faite avec un anticorps primaire qui visait la région C-terminal du récepteur APJ-R de rat. Il pouvait être utilisé contre des myocytes de chien puisque l'épitope était le même chez les deux espèces.

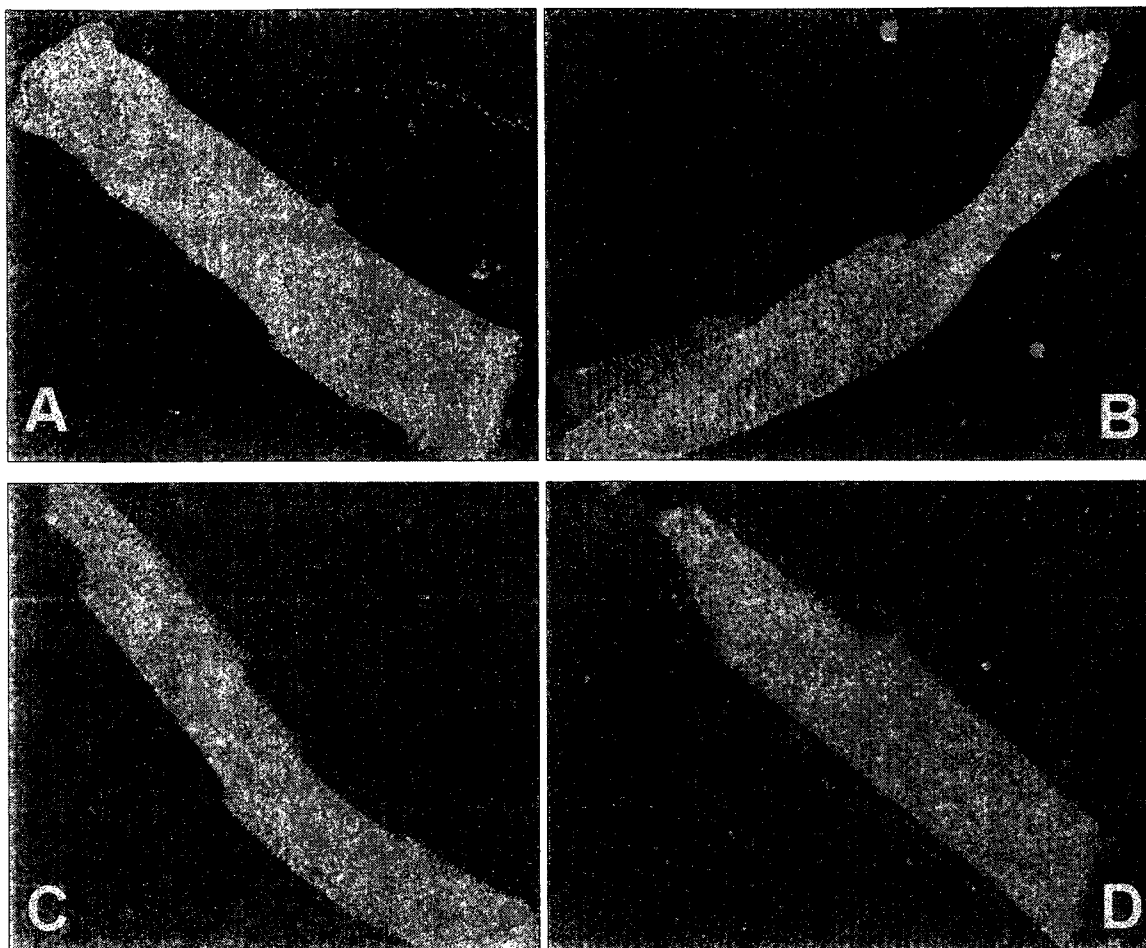


Figure 3.2.1 : Localisation du récepteur APJ-R au niveau des myocytes isolés du ventricule gauche de chien. Localisation du récepteur APJ-R en vert (A, B, C) et des noyaux cellulaires localisés par le propide d'iode en rouge (C). Détection du récepteur APJ-R avec l'anticorps préabsorbé avec le peptide correspondant à l'épitope (D).

Nous avons observé que le récepteur APJ-R se situe au niveau membranaire, plus précisément aux bandes-Z des myocytes. Suite à la pré-absorption de l'anticorps primaire avec le peptique épitope, le marquage devient non-spécifique, il n'est plus localisé aux bandes-Z. Ce résultat nous permet donc de confirmer que le marquage est bien spécifique au récepteur APJ-R. Cette localisation cellulaire renforce notre hypothèse que l'apéline

peut avoir une action sur le courant sodique, puisque ces derniers sont localisés également au niveau des bandes-Z dans les myocytes (Farkasfalvi et al. 2007 ; Kleinz et al. 2004 ; Haufe et al. 2005). Les études sur le courant sodique ont donc été effectuées.

3.3 Mesures du courant sodique cardiaque canin en présence d'apéline.

Le but de ces expériences était de confirmer notre hypothèse que l'apéline pouvait moduler le courant sodique. Les mesures furent faites sur des myocytes isolés du ventricule gauche de chien en condition contrôle et en présence de 100 nM d'apéline 13 ou d'apéline 17 pendant 20 minutes de perfusion.

Le premier protocole utilisé pour déterminer l'influence de l'apéline sur ce courant était le protocole standard de la relation courant sodique I_{Na} en fonction du V_m . Les courants furent normalisés en fonction de la capacitance de la cellule.

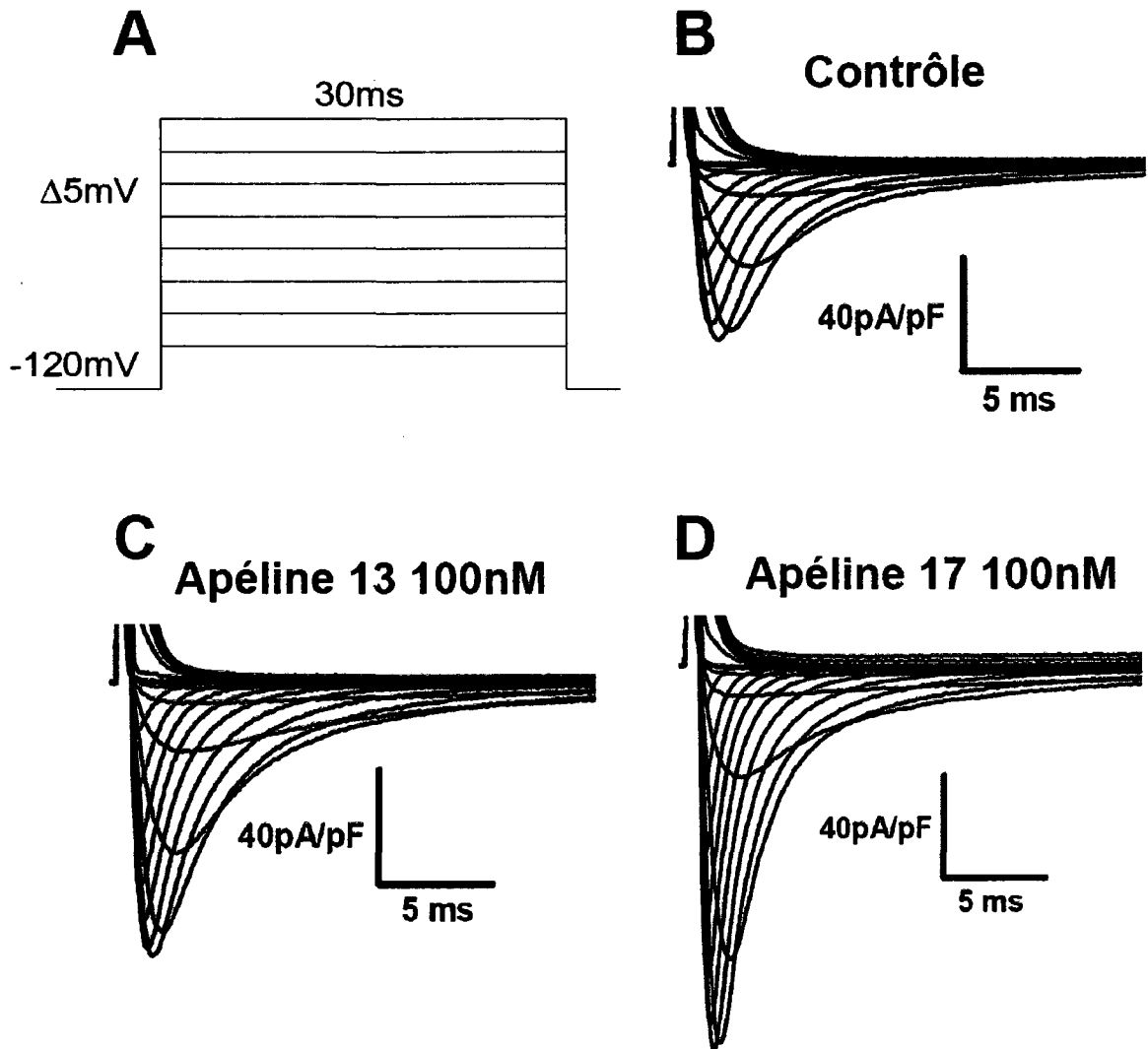


Figure 3.3.1 : Effet de l'apéline sur le courant sodique cardiaque au niveau des myocytes isolés du ventricule gauche de chien. Protocole utilisé pour la mesure des courbes courant-voltage I/V (A). Tracés représentatifs des courants sodiques à différents voltages en fonction du temps en condition contrôle (B), ou après 20 minutes de perfusion avec 100 nM d'apéline 13 (C) ou d'apéline 17 (D).

Nous avons observés à la figure 3.3.1 que l'apéline 13 et 17 augmente le courant sodique I_{Max} . Nous avons par la suite rapporté ces valeurs sur un graphique compilant le courant pic I_{Na} à chaque voltage tel qu'à la figure 3.3.2 A.

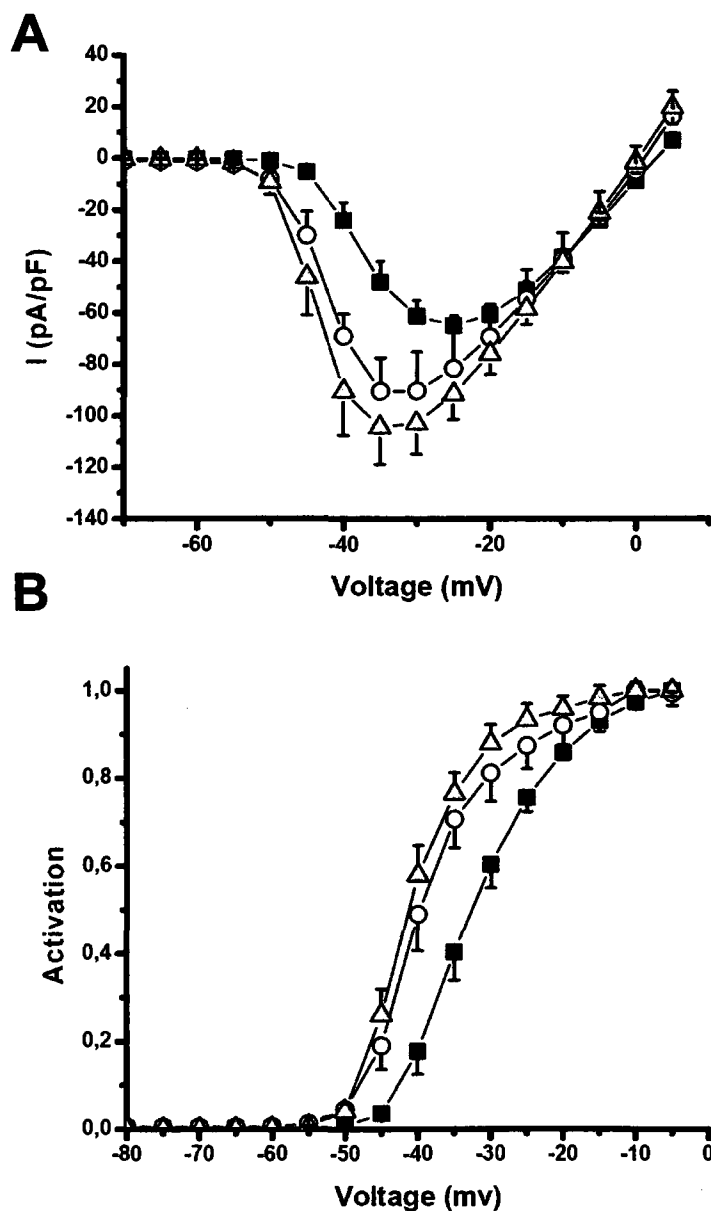


Figure 3.3.2 : Effet de l'apéline sur la relation I/V et sur la courbe d'activation du courant sodique au niveau des myocytes du ventricule gauche de chien. Courbes du courant sodique pic I_{Na} en fonction du V_m en condition contrôle (■ n=14), en présence de 100 nM

d'apéline 13 (\circ n=7) ou en présence de 100 nM d'apéline 17 (\blacktriangle n=7) (A). Courbes d'activation de I_{Na} en fonction du V_m dans les trois conditions (B). I_{Max} en présence d'apéline 13 et d'apéline 17 étaient significativement plus élevés qu'en condition contrôle (** $p < 0,01$). Les courbes d'activation de l'apéline 13 et 17 étaient significativement différentes de la condition contrôle (* $p < 0,05$). Les données représentent la Moyenne \pm SEM.

La moyenne des courants pics I_{Na} à chaque voltage présentée à la figure 3.3.2 A nous a permis d'observer que l'apéline 13 augmentait le courant I_{Max} de 39% et l'apéline 17 de 61% (contrôle = $(-64,8 \pm 3,8)$ pA/pF, apéline 13 = $(-90,4 \pm 13,0)$ pA/pF, apéline 17 = $(-104,3 \pm 14,4)$ pA/pF). Toutefois, il n'y a pas de différence significative de I_{Max} entre les deux formes d'apéline. Ainsi, l'apéline, sous ces deux formes, augmente le courant sodique de façon significative dans les myocytes isolés du ventricule gauche de chien.

La figure 3.3.2 A indique également que l'apéline a déplacé le I_{Max} vers des potentiels plus négatifs. Ce déplacement peut être une indication que la probabilité d'ouverture des canaux sodiques est modifiée en présence d'apéline. Pour mesurer cet effet, les courbes d'activation du canal sodique en fonction du V_m furent calculées. La figure 3.3.2 B représente l'activation du canal sur une échelle de 0 à 1 où 1 correspond à 100% d'activation. À l'aide d'un lissage de ces courbes avec l'équation de Boltzmann, nous avons observé que le voltage de la mi-activation ($V_{1/2}$) (50% des canaux ouverts) est significativement déplacé de -6,8 mV par l'apéline 13 et de -8,6 mV par l'apéline 17 comparativement aux conditions contrôles ($V_{1/2}$ contrôle = $(-31,9 \pm 0,3)$ mV, apéline 13 = $(-38,7 \pm 0,5)$ mV et apéline 17 = $(-40,5 \pm 0,3)$ mV). Toutefois, il n'y a pas de différence

significative dans le $V_{1/2}$ entre les deux formes d'apélines. Les valeurs de la pente entre les trois courbes sont similaires (k contrôle = $(5,6 \pm 0,3)$, apéline 13 = $(5,1 \pm 0,4)$ et apéline 17 = $(4,3 \pm 0,3)$). Ces résultats démontrent donc que l'apéline induit non seulement une augmentation de I_{Na} , mais également une augmentation de l'ouverture des canaux sodiques à des potentiels plus négatifs augmentant ainsi l'excitabilité cellulaire.

Puisque l'apéline modifie l'activation du canal sodique, nous avons voulu vérifier si elle a également un effet au niveau de son inactivation. Une modification de ce paramètre peut directement affecter l'excitabilité cellulaire.

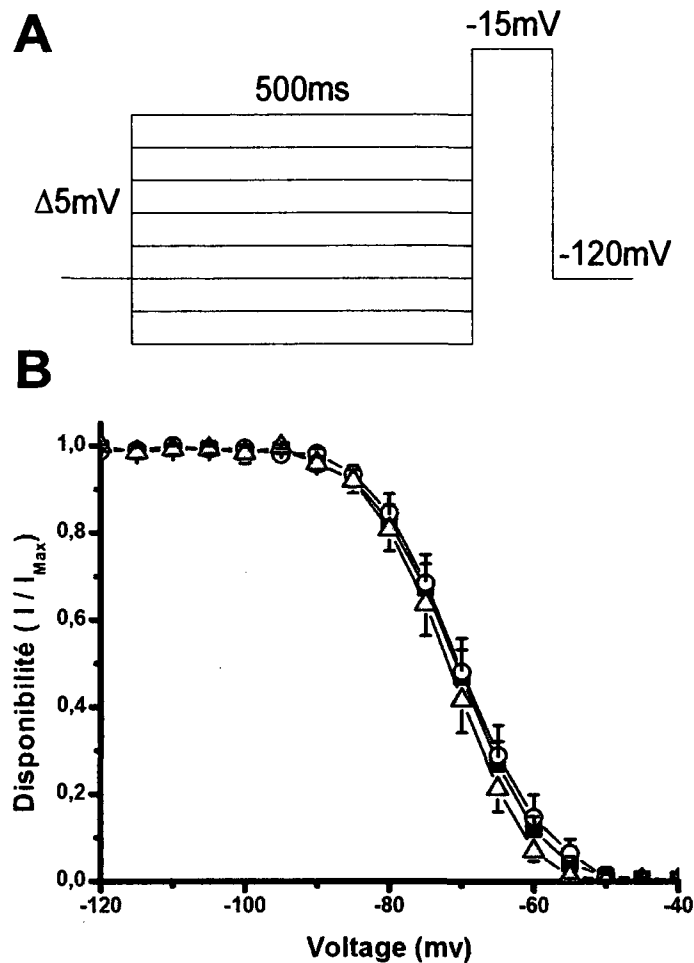


Figure 3.3.3 : Effet de l'apéline sur la courbe d'inactivation du canal sodique au niveau des myocytes isolés du ventricule gauche de chien. Protocole utilisé pour les courbes d'inactivation du courant sodique (A). Courbes d'inactivation de I_{Na} en fonction du V_m en condition contrôle (■ $n=12$), en présence de 100 nM d'apéline 13 (○ $n=5$) ou de 100 nM d'apéline 17 (△ $n=7$) (B). Le potentiel de mi-inactivation ($V_{1/2}$) et la pente (k) des courbes obtenus par un lissage de Boltzmann n'étaient pas significatifs ($p>0,05$).

La figure 3.3.3 A indique que l'apéline n'a pas d'effet sur l'inactivation du courant sodique. Les paramètres ne sont pas significativement différents selon les conditions, le

potentiel de la mi-inactivation $V_{1/2}$ étant de $(-70,9 \pm 0,1)$ mV en condition contrôle, de $(-70,4 \pm 0,2)$ mV en présence d'apéline 13 et de $(-72,1 \pm 0,1)$ mV en présence d'apéline 17. Les valeurs de pente k sont également semblables; $(5,7 \pm 0,1)$ en condition contrôle, $(5,7 \pm 0,2)$ avec l'apéline 13 et $(5,2 \pm 0,1)$ avec l'apéline 17. La présence d'apéline ne modifie donc pas l'inactivation du canal sodique en fonction du V_m . La disponibilité à l'ouverture du canal sodique selon le voltage est la même en présence ou en absence d'apéline, même si l'activation est déplacée vers des voltages plus négatifs.

Ce double phénomène a pour effet d'augmenter la fenêtre créée par la superposition des courbes d'activation et d'inactivation. Celle-ci nous permet de déterminer la quantité de courant sodique en arrière-plan. À certains voltages de maintien de la cellule, une fraction des canaux sera toujours disponible à l'ouverture (non inactivés) et une fraction des canaux s'activera à ce potentiel. Lorsque le potentiel membranaire est dans cette fenêtre, un petit courant traverse alors la membrane, créant un courant de fuite entrant de sodium. Ce courant se nomme le courant de fenêtre (I_{fNa}). Il fut établi par Hodgkin-Huxley par l'équation suivante; $I_{fNa} = G_{Max} m^3 h (V_m - E_{Na})$.

La figure 3.3.4 représente les superpositions des courbes d'activation et d'inactivation en conditions contrôle, en présence d'apéline 13 et d'apéline 17, ainsi que les courants de fenêtre I_{fNa} associés.

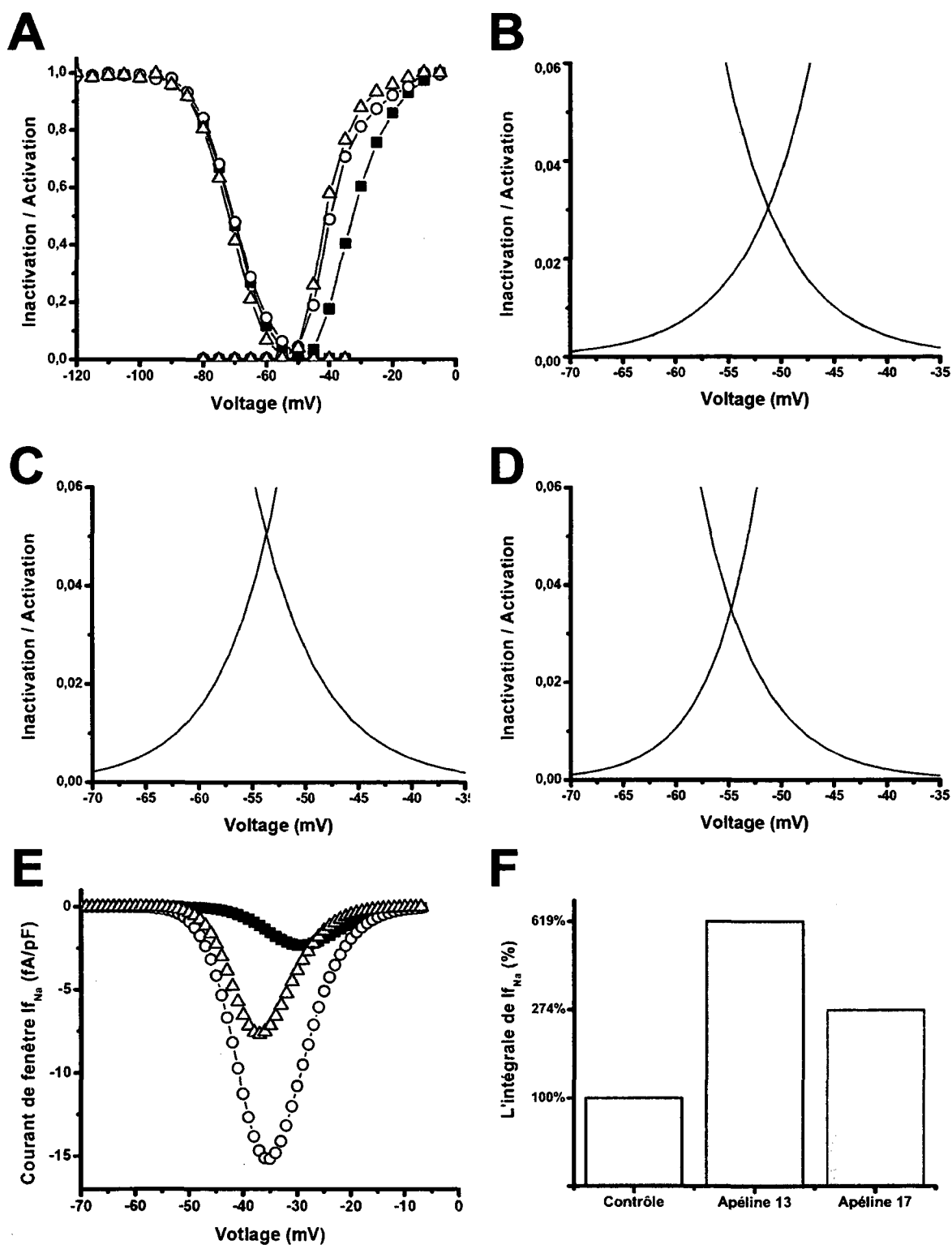


Figure 3.3.4 : Illustration de la fenêtre entre l'activation et l'inactivation par la juxtaposition des courbes et du courant de fenêtre $I_{f_{Na}}$ associé en présence d'apéline.

Superposition des courbes d'activation et d'inactivation en fonction du voltage en condition contrôle (■), en présence de 100 nM d'apéline 13 (○) ou en présence de 100 nM d'apéline 17 (▲) (A). Agrandissement de la fenêtre des courbes d'activation et d'inactivation en condition contrôle (B), en présence d'apéline 13 (C) et en présence d'apéline 17 (D). I_{fNa} calculés par l'équation de Hodgkin-Huley en fonction du V_m en condition contrôle (■), en présence d'apéline 13 100 nM (○) et en présence d'apéline 17 100 nM (▲) (E). L'intégrale de I_{fNa} selon les trois conditions (F).

L'apéline 13 augmente l'aire sous la courbe de la fenêtre entre l'activation et l'inactivation de 65% comparativement à la condition contrôle (figure 3.3.4). L'apéline 17 n'a pas d'effet sur l'ampleur de cette fenêtre. Toutefois, lorsque nous observons l'intersection entre les deux paramètres, nous avons remarqué que l'apéline la déplace vers des potentiels plus négatifs étant donné que l'activation est plus négative en présence d'apéline (contrôle : -51mV; apéline 13 : -53mV; apéline 17 : - 55mV). Cette modification dans l'intersection des courbes d'activation et d'inactivation modifie par conséquence I_{fNa} .

Les I_{fNa} furent par la suite calculés afin de visualiser la quantité de courant qui pouvait être activée à ces voltages (figure 3.3.4.E). Le voltage du pic de I_{fNa} est déplacé vers des potentiels plus négatifs en présence d'apéline consistant avec le déplacement de l'activation (Voltage du maximum de I_{fNa} ; contrôle : -29mV; apéline 13 : -35mV; apéline 17 : -37mV). Ainsi, l'apéline modifie la dépendance au voltage de I_{fNa} en l'activant à des potentiels plus négatifs. L'intégrale de I_{fNa} , représentant la charge électrique disponible, fut calculée par l'aire sous la courbe de I_{fNa} et est représenté à la figure 3.3.4.F. L'apéline

13 induit une augmentation de 619% de la charge électrique par rapport à la condition contrôle et l'apéline 17 induit tant qu'à elle une augmentation de 274%. En élevant I_{fNa} dans les myocytes du ventricule gauche, l'apéline a donc le potentiel d'augmenter la quantité de sodium à l'intérieur des cardiomyocytes.

Nous avons voulu par la suite déterminer l'effet de l'apéline sur la période réfractaire des canaux. Le protocole de la réactivation du canal sodique en fonction du temps fut utilisé.

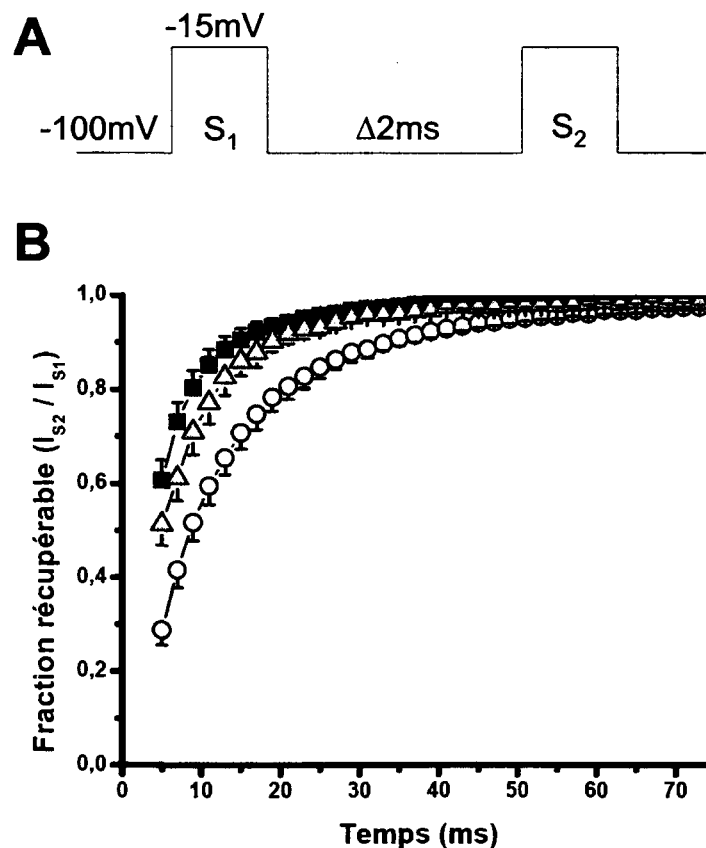


Figure 3.3.5 : Effet de l'apéline sur la courbe de réactivation du courant sodique au niveau les myocytes isolés du ventricule gauche de chien. Protocole à double saut utilisé pour la mesure des courbes de réactivation (A). Courbes de réactivation du canal sodique en fonction du temps en condition contrôle (■ n=11), en présence de 100 nM d'apéline 13 (○

n=5) ou de 100 nM d'apéline 17 (Δ n=7) (B). Par une comparaison des lissages, les trois courbes sont significativement différentes entre elles (* $p < 0,05$).

En transposant la valeur du courant de I_{S2} sur la valeur du courant I_{S1} en fonction du temps, nous avons obtenus le graphique de la fraction récupérable (FR) en fonction du temps (B). Nous avons remarqué que les canaux récupéraient moins rapidement en présence d'apéline. L'apéline 17 induit une récupération significativement plus rapide comparativement à l'apéline 13. L'apéline augmente donc le temps que le canal prend pour récupérer de sa dernière ouverture. Le tableau 3.3.1 résume les différents paramètres des courbes de réactivation obtenues.

3.3.1: Tableau des constantes de la réactivation				
Conditions	A1	t1	A2	t2
Contrôle	13%	18,65	86%	4,43
Apéline 13 100nM	6%	92,92	94%	11,45
Apéline 17 100nM	10%	25,30	89%	6,29

Tableau 3.3.1: Tableau des constantes des différents paramètres des courbes de réactivation. A_1 et A_2 de la réactivation : valeur en pourcentage des constantes de temps τ_1 et τ_2 dans l'équation de la courbe de lissage. τ_1 et τ_2 de la réactivation : valeur de tau pour cette section de la courbe.

Afin de vérifier si les voies de signalisation de PKA et de PKC étaient impliquées dans l'augmentation de I_{Na} par l'apéline du récepteur APJ-R, les protocoles de la relation courant-voltage furent utilisés en présence de différents agents modifiant les voies de signalisation de la PKA et de la PKC. Un mélange d'IBMX 100 mM et de 8-bromo-

AMPc 50 μ M fut utilisé dans le but d'activer la PKA. L'IBMX fut employé pour inhiber les phosphodiésterases ce qui empêchait l'hydrolyse d'AMPc (activateur de la PKA). Le 8-bromo-AMPc fut quant à lui utilisé comme activateur direct de la PKA en remplaçant l'AMPc. Le 8-bromo-AMPc est plus stable que l'AMPc puisqu'il n'est pas hydrolysable par les phosphodiésterases. Ainsi, ce cocktail fut mis en présence des cellules durant 20 minutes et également durant la prise des enregistrements afin d'évaluer l'impact de la PKA dans la voie de signalisation entre le récepteur APJ-R de l'apéline et le canal sodique.

L'effet de la PKC sur cette voie de signalisation fut également évalué. La chelerythrine à une concentration de 3 μ M fut utilisée pour inhiber l'effet de la PKC dans les myocytes. Les cellules furent préincubées 30 minutes avec la chelerythrine et elle fut également perfusée lors des enregistrements. La figure 3.3.7 représente les différents résultats obtenus par le protocole I/V sur le I_{Na} en présence d'activation de la PKA et de d'inhibition de la PKC avec l'apéline 13 à une concentration de 100 nM. Puisque les I_{Max} entre l'apéline 13 et l'apéline 17 de la courbe I/V n'étaient pas significatifs dans nos précédents résultats, seulement l'apéline 13 a été testée lors de l'étude de la voie de signalisation du récepteur.

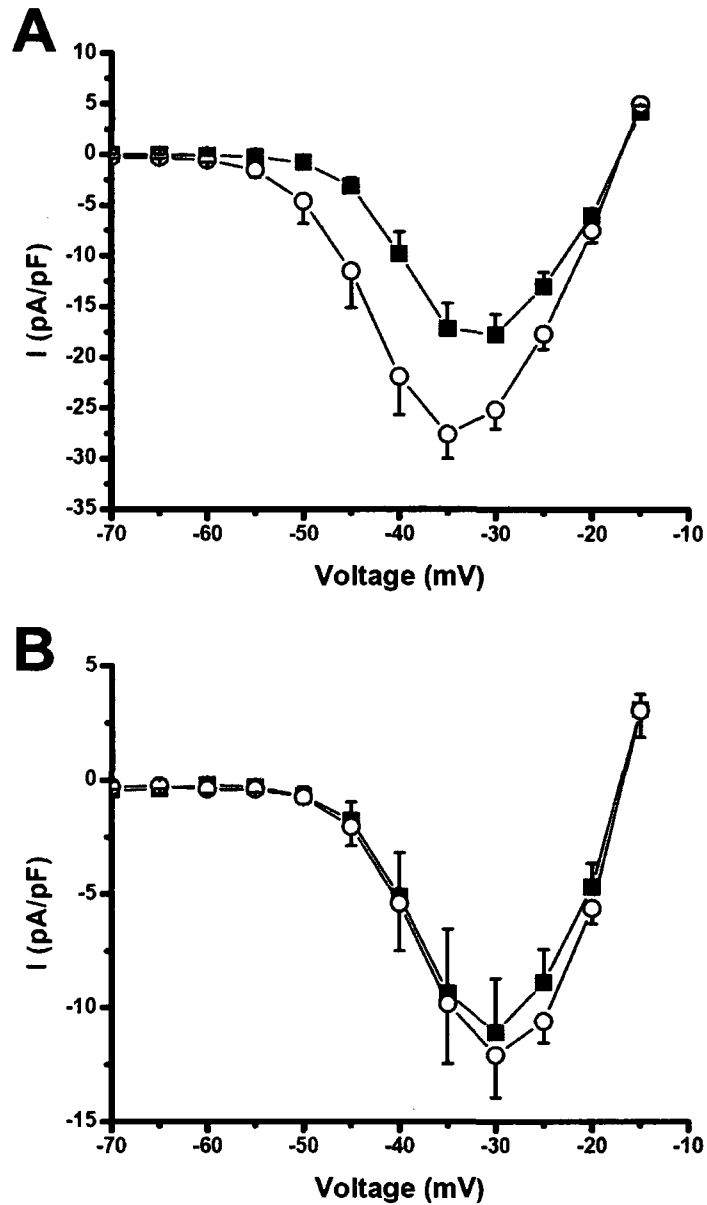


Figure 3.3.6 : Effets de la PKA, de la PKC et de l'apéline 13 sur la courbe I/V du courant sodique cardiaque chez des myocytes isolés du ventricule gauche de chien. Relation I/V en présence d'IBMX 100 mM+8-bromo-AMPc 50 μ M (■ n=6) et en présence d'IBMX 100 mM+8-bromo-AMPc 50 μ M + d'apéline 13 100 nM (○ n=6) (A). Relation I/V en présence de chelerythrine 3 μ M (■ n=5) et en présence de chelerythrine 3 μ M + d'apéline 13 100 nM (○ n=5) (B).

Le cocktail d'IBMX et de 8-bromo-AMPC a réduit I_{Max} de 35% en comparaison au contrôle (contrôle = $(-27,1 \pm 1,5)$ pA/pF; IBMX+8-Bromo-AMPC = $(-17,8 \pm 2,0)$ pA/pF). L'apéline 13 a tout de même augmenté I_{Max} de 55% en présence du cocktail (IBMX+8-Bromo-AMPC + apéline 13 = $(-27,6 \pm 2,4)$ pA/pF). Cette augmentation est similaire à celle observée en présence d'apéline 13 à la figure 3.3.2 (39%). Tous ces changements de I_{Max} sont significatifs entre les différentes conditions (* $p < 0,05$). Sur la figure 3.3.6 A, le I_{Max} en présence du cocktail et de l'apéline 13, comparativement au cocktail seul, est déplacé de -5mV, tout comme l'apéline à la figure 3.3.2. L'activation du courant sodique est donc encore une fois déplacée à des potentiels plus négatifs en présence d'apéline. Ces résultats nous indiquent que la PKA ne semble pas être impliquée dans la voie de signalisation entre le récepteur APJ-R et le canal sodique puisque l'activation de la PKA n'a pas modifié l'augmentation de I_{Na} par l'apéline entre les conditions contrôles ou après la stimulation de la PKA. Ainsi, l'effet de l'apéline sur le canal sodique semble être dû à une autre voie.

La chelerythrine induit une diminution de I_{Max} de 34% comparativement à la condition contrôle. À la figure 3.3.6 B, l'apéline 13 n'a pas augmenté de façon significative I_{Max} (chelerythrine = $(-11,1 \pm 2,4)$ pA/pF ; chelerythrine + apéline 13 = $(-12,1 \pm 1,9)$ pA/pF). L'augmentation de I_{Na} par l'apéline est donc inhibée par l'inhibition de la PKC. Également, I_{Max} en présence d'apéline-chelerythrine n'est pas déplacé vers des potentiels plus négatifs comparativement à la chelerythrine seule. Ainsi, le déplacement de l'activation du canal sodique par l'apéline est inhibé par l'inhibition de la PKC. Ces résultats nous indiquent qu'en condition normale, la PKC induit une augmentation du

courant sodique basal, puisque son inhibition induit une diminution du courant sodique. L'effet de l'apéline semble complètement disparue par l'inhibition de la PKC ce qui suggère que le récepteur APJ-R utilise en partie la voie de la PKC afin d'augmenter le courant sodique et que l'apéline a un effet de potentialisation sur cette voie.

4 : DISCUSSION :

4.1 : Présence du récepteur APJ-R.

Nos résultats démontrent pour la première fois dans la littérature que le récepteur APJ-R est présent chez le chien au niveau du ventricule gauche. La présence de son ARNm dans le cœur est détectée dans plusieurs études chez d'autres espèces, tel que le rat, la souris et l'homme (Hosoya et al. 2000; O'Carroll et al. 2000; Kleinz et al. 2005). Le chien, plutôt qu'une espèce de rongeur, a été utilisé comme modèle du courant sodique dans notre étude puisqu'il s'agit de l'espèce animale ayant la plus grande similitude au niveau de l'électrophysiologie cardiaque avec l'homme. En effet, les potentiels d'action et les courants ioniques associés sont similaires à l'homme. Grâce à ces ressemblances, des extrapolations des résultats obtenus avec notre modèle canin sur le fonctionnement du cœur humain sont plus fiables.

Nous avons détecté trois bandes distinctes par immunobuvardage, comparativement à nos attentes d'une seule bande de 42kDa. Même si cette dernière est bien observée, et similaire au contrôle positif du récepteur APJ-R au niveau du cerveau de rat, deux bandes additionnelles sont observées à environ 80 et 160 kDa. Puisque les poids observés sont des multiples de deux ou de quatre de la taille du récepteur, il est possible qu'il s'agisse d'homodimère ou de homotétramère du récepteur. En effet, l'homodimérisation d'un récepteur appartenant à la famille des RCPG est déjà démontrée dans la littérature par l'équipe de Nekrasova sur un récepteur olfactif en condition physiologique (Nekrasova et al. 1996). Ainsi, le récepteur APJ-R pourrait également se comporter de cette façon dans

le ventricule gauche de chien. Il est aussi possible qu'il s'agisse de différentes formes de glycolisations du récepteur dans ce tissu spécifique. Ces glycolisations ajoutent un poids supplémentaire à la protéine, ce qui peut également expliquer les différences de poids observées. D'autres expériences d'immunobuvardage avec différentes conditions d'extraction protéique seront nécessaires pour démontrer ces phénomènes. Comme notre objectif était de seulement déterminer sa présence dans notre modèle animal, une investigation plus en profondeur n'a pas été effectuée.

4.2 Localisation du récepteur APJ-R au niveau des bandes-Z des myocytes du ventricule gauche.

Nos résultats démontrent que le récepteur APJ-R de l'apéline est situé aux niveaux des bandes-Z des myocytes isolés. Cette localisation cellulaire est un endroit clé pour la modulation de la contraction musculaire. En effet, les bandes-Z sont co-localisées avec les tubules-T. Ces derniers comportent la machinerie contractile tels que les canaux ioniques de la membrane sarcoplasmique et les récepteurs de la ryanodine. Cette co-localisation entre la machinerie contractile et le récepteur APJ-R est en relation avec le rôle physiologique de l'apéline; l'augmentation de la contractilité cardiaque. Les bandes-Z sont également l'endroit où les canaux sodiques de type $Na_v1.5$, la forme cardiaque prédominante dans le cœur (Haufe et al. 2005) sont situés. Ainsi, il y a une co-localisation entre le récepteur APJ-R et le canal sodique, ce qui laisse fortement suggérer que l'apéline pourrait avoir un effet direct sur ce dernier.

Nos résultats sont similaires à ceux de l'équipe de Farkasfalvi qui démontre que le récepteur APJ-R est situé au niveau des bandes-Z et des disques interscalaires chez les myocytes de rat (Farkasfalvi et al. 2007). La non détection sur nos myocytes aux disques intercalaires pourrait résulter à une localisation spécifique aux rongeurs. Également, la structure cellulaire rectangulaire des myocytes n'était pas conservée dans leurs cellules, laissant suggérer que des différences dans l'isolation cellulaire affectant la structure cellulaire peuvent également affecter la localisation du récepteur. L'équipe de Kleinz démontre quant à elle que le récepteur se situe également au niveau des bandes-Z dans des myocytes humains (Kleinz et al. 2004). La similitude entre leurs résultats chez l'homme et les nôtres chez le chien nous indique que le modèle canin est d'autant plus approprié pour l'étude de la relation entre le courant sodique et l'apéline.

4.3 Augmentation du courant sodique en présence d'apéline.

Nos résultats démontrent que l'apéline, autant sous la forme de 13 que 17 acides aminés, augmente significativement le courant sodique dans les myocytes du ventricule gauche de chien. L'augmentation de ce courant est susceptible d'induire une modification de la concentration intracellulaire de sodium. Cette modification de concentration pourrait être responsable de l'effet inotrope positif de l'apéline. En effet, une augmentation de sodium intracellulaire aurait un effet sur l'efficacité de l'échangeur NCX à extruder le calcium intracellulaire. Sa vitesse d'échange est déterminée par les concentrations de part et d'autre de la membrane des deux ions impliqués ainsi que du potentiel membranaire. Lorsque l'échangeur NCX est en mode normal, soit lors de la phase plateau du potentiel d'action, le calcium est exclu de la cellule par l'échange de l'entrée de sodium. Comme

les concentrations intracellulaires de sodium seraient plus élevées par l'augmentation du courant sodique par l'apéline, l'efficacité de NCX serait plus faible, ce qui diminuerait l'efflux de calcium et ainsi prolongerait l'élévation calcique intracellulaire pendant la contraction cardiaque. Également, lorsque l'échangeur NCX agirait en mode inverse, soit une entrée de calcium couplée à une sortie de sodium (en phase 0 et 1 du potentiel d'action), une augmentation de sodium intracellulaire favoriserait l'exclusion de sodium par NCX, menant à une augmentation de l'entrée de calcium par cet échangeur. La relation entre l'augmentation du courant sodique et l'augmentation du calcium intracellulaire par l'apéline devra être confirmées puisque les résultats obtenus des mesures des concentrations intracellulaires transitoires de calcium suite à l'exposition de l'apéline ne sont pas concluant (résultats présentés à l'appendice 1). Toutefois, la relation entre l'augmentation du courant sodique et la possible implication de l'échangeur NCX concordent avec les résultats de Szokodi. Son étude démontre que l'effet inotrope positif de l'apéline est lié du mode inverse de NCX. Lorsqu'il est inhibé, l'augmentation de la force contractile diminue de moitié. Ainsi, il semble y avoir une relation étroite entre le courant sodique, la concentration de sodium intracellulaire, l'échangeur NCX et l'augmentation de la force contractile de l'apéline. Ceci nous a amené à poser l'hypothèse que l'augmentation du courant sodique par l'apéline peut être la cause de l'augmentation de la force de contraction cardiaque de cette hormone.

L'apéline 17 a une meilleure capacité d'augmenter le courant sodique comparativement à l'apéline 13 (61% avec apéline 17 vs 39% avec apéline 13). L'ajout de quatre acides aminés en N-terminal peut modifier son efficacité. Dans la littérature, il est démontré que l'efficacité des effets des différentes formes d'apéline est proportionnelle à la longueur du

fragment, le plus court agissant le plus rapidement (Kleinz et Daveport. 2005). Puisque des comparaisons de la vitesse de l'effet entre l'apéline 13 et l'apéline 17 n'ont pas été faites et que toutes les mesures ont été prises après 20 minutes de perfusion, nous ne pouvons pas déterminer une efficacité de liaison à ce moment-ci. Toutefois, la durée de l'effet est associée à la longueur, le plus long fragment induisant un effet plus persistant sur la cellule puisque l'internalisation du récepteur APJ-R est plus grande lorsqu'il lie un petit ligand, ayant pour effet de diminuer la durée de son action (Masri et al. 2006). Ainsi, il est possible que l'augmentation du courant sodique par l'apéline 13 soit moins importante que l'apéline 17 puisque le complexe récepteur-apéline 13 serait plus rapidement internalisé à l'intérieur du myocytes, réduisant son effet (Masri et al. 2006). Des études complètes de l'effet maximal en fonction du temps avec chaque fragment d'apéline devront être effectuées pour confirmer ces hypothèses.

L'étude de l'activation du canal sodique en fonction de la courbe I/V indique que l'apéline active I_{Na} à des voltages plus négatifs. Les canaux sodiques ont la propriété de s'ouvrir à des potentiels plus négatifs. Ainsi, lorsque la membrane est faiblement dépolarisée par une cellule adjacente, la probabilité de déclencher un potentiel d'action est plus grande en présence d'apéline. Donc, une plus faible dépolarisation de la membrane est nécessaire pour activer l'ouverture des canaux sodiques et amorcer un potentiel d'action. Cette modification dans l'activation du courant sodique est susceptible d'augmenter l'excitabilité cellulaire. De plus, les courbes d'inactivation du canal sodique en fonction du voltage indiquent que l'apéline ne modifie pas la disponibilité du canal. Ainsi, les canaux ont la même disponibilité selon le voltage, mais s'ouvriront à des voltages plus négatifs.

Cette augmentation de l'excitabilité cellulaire concorde avec les résultats des études de la conduction électrique ventriculaire de Farkasfalvi (Farkasfalvi et al. 2007). En effet, selon cette étude l'apéline induit une augmentation de la fréquence spontanée d'activation et de la vitesse de conduction entre les myocytes. Les auteurs expliquent cet effet de l'apéline par la présence du récepteur APJ-R aux niveaux des disques intercalaires des myocytes de rat, ce qui n'est pas observé dans nos myocytes canins. Toutefois, nos résultats indiquent que ces modifications électrophysiologiques observées par Farkasfalvi sont dues à une augmentation de l'excitabilité cellulaire causée les changements des propriétés du courant sodique. L'augmentation d'excitabilité cellulaire par l'activation du canal sodique peut également être un facteur important dans l'augmentation de la force contractile du cœur. Elle permet une meilleure dépolarisation des ventricules puisque le potentiel d'action se propage plus rapidement entre les myocytes et induit donc une meilleure coordination de la contraction des ventricules.

Par le calcul théorique du courant de fenêtre, l'apéline 13 et l'apéline 17 induisent une augmentation du courant de fenêtre de l'ordre de 619% et 274% respectivement. Le courant de fenêtre est le faible courant entrant autour du potentiel de repos. Nos résultats indiquent qu'en présence d'apéline, le courant de fuite est plus grand, et induit une augmentation de l'entrée de sodium. Cette petite entrée induirait de faibles modifications des concentrations intracellulaires de sodium et entraînerait par conséquence des modifications dans la vitesse d'échange de NCX. Par le même raisonnement mentionné ci haut, la modification au niveau de NCX pourrait induire des augmentations de calcium intracellulaire créant l'effet inotrope positif de l'apéline. L'augmentation du courant de

fenêtre pourrait également amener les cellules à un potentiel membranaire cellulaire plus dépolarisé et ainsi contribuer à l'augmentation de l'excitabilité cardiaque. Effectivement, le courant nécessaire pour atteindre le potentiel seuil devra être moins grand puisque la différence entre le potentiel membranaire et le potentiel seuil est moins grande. Ainsi, un plus petit courant entrant serait nécessaire pour déclencher le potentiel d'action.

Le pic du courant de fenêtre est également déplacé vers des potentiels plus négatifs en présence d'apéline comparativement au contrôle. Cet effet est directement relié au déplacement négatif de la courbe d'activation observé. Par conséquence, le courant de fenêtre sera non seulement plus grand, mais également plus élevé à des potentiels plus négatifs, potentiels où la cellule est plus propice à être excitée. Une augmentation de la probabilité d'ouverture du courant aurait également comme conséquence de modifier à la hausse les concentrations intracellulaires de sodium et donc la contraction cardiaque. L'augmentation du courant sodique et du courant fenêtre, le déplacement négatif de la courbe d'activation et du courant de fenêtre ainsi que la même disponibilité des canaux selon le voltage suggèrent tous que l'excitabilité cellulaire des myocytes du ventricule gauche du chien serait augmentée par l'apéline.

L'augmentation de l'excitabilité cellulaire peut par contre affecter négativement la contraction cardiaque et créer des problèmes de rythme cardiaques. En effet, un cœur plus excitable peut perdre sa rythmicité provenant du nœud AV, par des stimulations électriques provenant de d'autres cellules avoisinantes. Cet effet peut donc engendrer des tachycardies cardiaques. Toutefois, les résultats sur la réactivation du canal sodique démontrent que l'apéline crée un plus grand délai de la réactivation du canal après une

stimulation. Cette augmentation du temps nécessaire entre deux stimulations va donc produire un allongement de la période réfractaire du cœur (période après un potentiel d'action où le ventricule n'est pas excitable pour un nouveau potentiel d'action). Puisque le canal est dans un état inactivé pendant une plus longue période de temps après une première stimulation, il n'est plus disponible pour la réouverture. Cet effet de l'apéline peut prévenir les effets néfastes de l'augmentation de l'excitabilité cardiaque amenée par le déplacement négatif de l'activation du courant sodique. Celle-ci va induire une meilleure dépolarisation du ventricule, tandis que l'augmentation de la période réfractaire va permettre un meilleur contrôle du rythme cardiaque ventriculaire.

4.4 Augmentation du courant sodique par l'activation de la PKC.

Nos résultats sur la voie de signalisation du récepteur APJ-R de l'apéline ont démontré que l'activation de la PKA n'a aucun effet sur l'augmentation du courant sodique par l'apéline. Par contre, l'inhibition de la PKC, amène une perte de l'action de l'apéline sur le courant sodique. Ainsi, la voie de signalisation du récepteur APJ-R est par l'activation de la PKC. Ce résultat est en accord avec les résultats de l'étude de Szokodi qui démontre que l'effet inotrope positif de l'apéline est en partie dépendant de l'activation de la PKC (Szokodi et al. 2002). Cette étude démontre que l'apéline active directement son récepteur APJ-R, la protéine G_i associée, la PLC et par la suite la PKC. L'effet de l'inhibition de la PKC n'est toutefois pas total comme le démontre notre étude du courant sodique. Par contre, le GF-109203X (inhibiteur direct de la PKC) fut utilisé par Szokodi pour leur étude, comparativement à la cheletythrine (inhibiteur de la translocation de la PKC du cytosol à la membrane plasmique). La différence entre les mécanismes

d'inhibition peut induire les différences entre les deux études. Également, le paramètre étudié dans l'effet de l'apéline était la force de contraction du cœur dans l'étude de Szokodi. L'effet de l'augmentation du courant sodique peut ne pas être le seul mécanisme de l'effet inotrope positif de l'apéline, expliquant ainsi pourquoi ils observent une augmentation résiduelle de la force contractile en présence d'apéline et de GF-109203X.

Les équipes de Szokodi et de Farkasfalvi démontrent que l'échangeur NHE est également impliqué dans l'effet inotrope positif (Szokodi et al. 2002; Farkasfalvi et al. 2007). Ils démontrent que l'inhibition de l'échangeur NHE diminue l'augmentation de la contraction cardiaque. L'augmentation de la vitesse d'échange de ce dernier induit une alcalisation de la cellule par une plus grande sortie d'hydrogène couplé à une entrée de sodium. Cette alcalinisation induit une augmentation de la sensibilité des filaments d'actine au calcium, et mène à une augmentation de la contraction cardiaque. Bien que ce mécanisme explique l'effet résiduel de l'inhibition de la PKC sur l'augmentation de la force de contraction par Szokodi, il est difficile de rapporter ces résultats aux nôtres. Nos résultats indiquent que l'apéline mène à une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium. Cette augmentation devrait par conséquent diminuer la vitesse de cet échangeur NHE à exclure l'hydrogène et induire une acidification cellulaire. Par contre, l'effet observé de Farkasfalvi est très transitoire, de l'ordre de une à deux minutes et est complètement disparu après huit minutes de perfusion d'apéline. Il se pourrait donc que cet effet soit bien présent, mais qu'il ne persiste pas tout au long de l'augmentation de la force de contraction cardiaque. Nos résultats sont effectués après une perfusion de vingt minutes en présence d'apéline. L'effet de l'augmentation du courant sodique n'est pas observé après une courte perfusion d'apéline d'une à deux minutes comme dans leur étude. Ainsi,

l'augmentation de la vitesse de l'échangeur NHE pourrait effectivement être présent au commencement de l'effet inotrope de l'apéline, mais disparaître au fur et à mesure que l'augmentation du courant sodique apparaîtrait.

L'activation de la PKC par le récepteur APJ-R dans les myocytes est un phénomène doublement intéressant lorsqu'il est comparé à l'effet hypertenseur de l'apéline. En effet, celle-ci provoque une vasoconstriction de la veine saphène dénudée d'endothélium (Katugampola et al. 2001). En absence de production de NO par les cellules endothéliales, l'apéline peut aller se lier directement à son récepteur sur le muscle vasculaire et provoquer la contraction. La littérature stipule que la contraction est engendrée par les voies classiques de l'activation de la PKC et de l'augmentation de calcium intracellulaire dans ce type cellulaire, tel que démontré à la figure 1.2.2 (Kleinz et Daveport. 2005). L'effet sur le muscle cardiaque pourrait donc être le même que dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. En effet, le muscle cardiaque ne possède pas de cellules endothéliales comme en possède les vaisseaux sanguins. Ainsi, les résultats obtenus avec des vaisseaux dénudés d'endothélium peuvent être comparés avec ceux du muscle cardiaque. Il y a donc une concordance dans la contraction de ces deux types de tissu par l'apéline et les deux semblent impliquer l'activation de la PKC. Des études approfondies sur l'activation de la PKC et sur l'activation du courant sodique dans les cellules musculaires lisses devront être effectués pour confirmer ces hypothèses.

5 : CONCLUSION

Notre étude est la première à évaluer l'effet de l'apéline dans un modèle de myocytes ventriculaires de chien. Le récepteur APJ-R est détecté pour la première fois dans ce tissu. De plus, il est localisé aux niveaux des bandes-Z démontrant sa possible implication dans la contractilité cellulaire. Notre étude est la première à évaluer l'effet de l'apéline sur le courant sodique cardiaque. Nos résultats démontrent avec évidence que l'apéline 13 et l'apéline 17 augmentent le courant sodique cardiaque et le courant de fenêtre sodique dans les myocytes isolés. L'apéline déplace la dépendance au voltage de l'activation du canal et du courant de fenêtre vers des potentiels plus négatifs, sans toutefois modifier la dépendance au voltage de l'inactivation. Ce phénomène crée donc une augmentation de l'excitabilité cellulaire des ventricules, sans toutefois modifier la disponibilité des canaux. L'augmentation du temps de réactivation par l'apéline mène à l'hypothèse que l'apéline peut également augmenter la période réfractaire entre les potentiels d'action, jouant un effet bénéfique sur la diastole du cœur. Enfin, les études de signalisation du récepteur APJ-R démontrent que l'effet de l'apéline sur le courant sodique est directement lié à l'activation de la PKC et non de la PKA.

Ces résultats ouvrent la porte à plusieurs autres projets d'études. En autres, la voie de signalisation entre le récepteur APJ-R et le canal sodique devra être plus étudiée en profondeur, afin de confirmer l'implication de la protéine G_i , de possiblement de la PLC et de la phosphorylation possible du canal par la PKC. Également, le mécanisme direct de l'augmentation du courant sodique sur l'augmentation de la force contractile par les modifications de concentrations de sodium intracellulaires et de la vitesse de l'échangeur

NCX devra être confirmé. Notre étude est effectuée chez le chien, qui est un très bon modèle animal pour les études électrophysiologiques cardiaques. Par contre, nos résultats devront être confirmés éventuellement chez l'homme. Enfin, les différences entre les insuffisants cardiaques et les cœurs sains devront eux aussi être caractérisées.

6. REMERCIEMENT :

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Robert Dumaine, de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Son savoir scientifique, autant théorique que technique, pour l'électrophysiologie a été un apport majeur dans la réalisation de ma maîtrise.

Je remercie également les deux étudiants post-doctoraux qui ont travaillé dans mon laboratoire, Dr Hector Barajas et Dr Volker Haufe. Dr Barajas était présent lors de mes expériences de patch-clamp. Il m'a apporté le support nécessaire lors de longue journée de travail. Dr Haufe était présent durant les deux premières années de ma maîtrise et il m'a toujours bien porté conseils dans toutes mes expériences par ses connaissances scientifiques.

Mes deux assistants de recherche ont également été d'une aide considérable. Je tiens particulièrement à remercier Marie-Hélène Fecteau pour tout son soutien. Elle m'a autant aidé lors de la planification de mes expériences, lors de mes expériences et également pour toutes les formalités administratives reliées à mon projet ou à la Faculté. De plus, son soutien moral a été un grand support durant les deux années de collaboration. Je tiens également à souligner l'aide de Dr Jean-François Delabre qui a pris la relève de Marie-Hélène après son départ.

Je tiens également à remercier Dr Daniel Payet et son assistante de recherche Line Bilodeau pour m'avoir enseigné la méthode pour les mesures des transitoires calciques dans les myocytes.

Le personnel de soutien du département, soit Jean Lainé, Kathleen Bélanger et Denise Girardin, a été d'une grande aide pour leur soutien scientifique et administratif.

Tous les autres étudiants du laboratoire, soit les stagiaires, ont été également d'une aide appréciée autant au point de vue des expériences, des discussions amiables et pour l'ambiance qu'ils apportaient au laboratoire.

Afin, je tiens à remercier tous les membres du département et hors du département, avec lesquels j'ai eu l'opportunité de travailler ou de discuter durant mes deux dernières années. Le plaisir que j'ai eu à faire ma maîtrise au CHUS n'aurait pas été le même sans vous.

7. BIBLIOGRAPHIE :

Alvarez, BV. et al. 1999. *Mechanisms underlying the increase in force and Ca^{2+} transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect.* Circ Res. 1999 Oct 15;85(8):716-22.

Azizi, M. et al. 2008. *Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli.* J Am Soc Nephrol. 2008 May;19(5):1015-24.

Berry, MF. et al. 2004. *Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts.* Circulation. 2004 Sep 14;110(11 Suppl 1):II187-93.

Bers, DM. et al. 2002. *Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference?* J Mol Cell Cardiol **34**: 369

Bers, DM. 2002. *Cardiac excitation-contraction coupling.* Nature. 2002 Jan 10;415(6868):198-205.

Boren W. et Boulpaep E. 2005. *Medical Physiology.* 11th Edition. Elsevier, 2005;1-1344.

Boucher, J. et al. 2005. *Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity.* Endocrinology. 2005 Apr;146(4):1764-71.

Chadwick, AV. 2007. *The Trilobite: Enigma of Complexity*. Southwestern Adventist University Keene, Texas. 2007.

<http://origins.swau.edu/papers/complexity/trilo/eng/index.html>.

Chen, MM. et al. *Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction*. Circulation. 2003 Sep 23;108(12):1432-9.

Cheng, X. et al. 2003. *Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats*. Eur J Pharmacol. 2003 Jun 6;470(3):171-5.

Choe, H. et al. 1998. *The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1*. J Virol. 1998 Jul;72(7):6113-8.

Chong, KS. et al. 2006. *Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure*. Eur J Heart Fail. 2006 Jun;8(4):355-60.

Cohen, RA. et Vanhoutte, PM. 1995. *Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP*. Circulation. 1995 Dec 1;92(11):3337-49.

Dai, T. et al. 2006. *Apelin increases contractility in failing cardiac muscle*. Eur J Pharmacol. 2006 Dec 28;553(1-3):222-8.

De Mota, N. et al. 2004. *Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 13;101(28):10464-9.

Edinger, AL. et al. 1998. *An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus.* J Virol. 1998 Oct;72(10):7934-40.

El Messari, S. et al. 2004. *Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure.* J Neurochem. 2004 Sep;90(6):1290-301.

Farkasfalvi, K. et al. 2007. *Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology.* Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 15;357(4):889-95.

Francia, P. et al. 2006. *Cardiac resynchronization therapy increases plasma levels of the endogenous inotrope apelin.* Eur J Heart Fail. 2007 Mar;9(3):306-9.

Földes, G. et al. 2003. *Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure.* Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 29;308(3):480-5.

Garden, RW. et al. 1999. *Formation of N-pyroglutamyl peptides from N-Glu and N-Gln precursors in Aplysia neurons.* J Neurochem. 1999 Feb;72(2):676-81.

Goetze, JP. et al. 2005. *Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease.* Regul Pept. 2006 Jan 15;133(1-3):134-8.

Habata, Y. et al. *Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum.* Biochim Biophys Acta. 1999 Oct 13;1452(1):25-35.

Hashimoto, T. et al. 2006. *Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jun;26(6):1267-72.

Haufe, V. et al. 2005. *Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart.* J Physiol. 2005 May 1;564(Pt 3):683-96.

Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Second Edition. Sinauer, 1992;1-544.

Hodgkin, AL and Huxley, AF. 1952a. *The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo.* J. Physiol. (London). 166:473-496[2].

Hodgkin, AL and Huxley, AF. 1952b. *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo.* J. Physiol (London). 116:497-506[2].

Horn, R. 2005. *How ion channels sense membrane potential.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 5;102(14):4929-30.

Hosoya, M. et al. 2000. *Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin.* J Biol Chem. Jul 14 2000;275(28):21061-7

Ishida, J. et al. 2004. *Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo.* J Biol Chem. 2004 Jun 18;279(25):26274-9.

Iwanaga, Y. et al. *Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system.* J Mol Cell Cardiol. 2006 Nov;41(5):798-806.

Jia, YX. et al. 2005. *Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats.* Regul Pept. 2006 Jan 15;133(1-3):147-54.

Jia, YX. et al. 2007. *Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas.* Peptides. 2007 Oct;28(10):2023-9.

Kang M, Walker JW. 2006. *Endothelin-1 and PKC induce positive inotropy without affecting pHi in ventricular myocytes.* Exp Biol Med 2006;231: 865–870.

Kasai, A. et al. 2004. *Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun. 2004 Dec 10;325(2):395-400.

Katugampola, SD. et al. 2001. *[(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man.* Br J Pharmacol. 2001 Mar;132(6):1255-60.

Katz, Arnold M. 2001. *Physiology of the heart*. Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2001;1-581.

Kawamata, Y. et al. 2001. *Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding.* Biochim Biophys Acta. 2001 Apr 23;1538(2-3):162-71.

Kleinz, MJ. et Baxter, GF. 2008. *Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase.* Regul Pept. 2008 Feb 7;146(1-3):271-7.

Kleinz, MJ. et Davenport, AP. 2004. *Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells.* Regul Pept. 2004 May 15;118(3):119-25.

Kleinz, MJ. et Davenport, AP. 2005. *Emerging roles of apelin in biology and medicine.* Pharmacology & Therapeutics 2005;107:198-211.

Kleinz, MJ. et al. 2005. *Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells.* Regul Pept. 2005 Mar 30;126(3):233-40.

Krämer, BK. et al. 1991. *Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H⁺ exchanger.* Circ Res. 1991 Jan;68(1):269-79.

Kuba, K. et al. 2007. *Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload.* Circ Res. 2007 Aug 17;101(4):e32-42.

Lambrecht, NW. et al. 2006. *Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion.* Physiol Genomics. 2006 Mar 13;25(1):153-65.

Lee, DK. et al. 2000. *Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor.* J Neurochem 2000;74:34-41.

Llorens-Cortès, C. et Beaudet, A. 2005. *L'apéline, un inhibiteur naturel de l'effet antidiurétique de la vassopressine.* Medecine/Sciences 2005 ;21 :741-6.

Masri, B. et al. 2002. *Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein.* Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jan 11;290(1):539-45.

Masri, B. et al. 2006. *The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments.* J Biol Chem. 2006 Jul 7;281(27):18317-26.

Mills, GD. et al. 2007. *Intracellular sodium determines frequency-dependent alterations in contractility in hypertrophied feline ventricular myocytes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Feb;292(2):H1129-38.

Medhurst, AD. et al. 2003. *Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin.* J Neurochem. 2003 Mar;84(5):1162-72.

Nekrasova. E. et al. 1996. *Overexpression, solubilization and purification of rat and human olfactory receptors.* Eur. J. Biochem. 1996 ;238 :28-37.

O'Carroll, AM. et al. 2000. *Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues.* Biochim Biophys Acta. 2000 Jun 21;1492(1):72-80.

O'Dowd, B.F. et al. 1993. *A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11.* Gene. Dec 22;136(1-2):355-60.

O'Rourke B. et al. 1999. *Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies.* Circ Res. 1999 Mar 19;84(5):562-70.

Pogwizd SM. et al. 1999. *Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure.* Circ Res. 1999 Nov 26;85(11):1009-19.

Puffer, BA. et al. 2000. *Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses.* Virology. 2000 Oct 25;276(2):435-44.

Reaux, A. et al. 2001. *Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain.* J Neurochem. 2001 May;77(4):1085-96.

Reaux, A. et al. 2002. *Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain.* Neuroscience. 2002;113(3):653-62.

Reaux-Le Goazigo, A. et al. 2004. *Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons.* Endocrinology. 2004 Sep;145(9):4392-400.

Simpkin, JC. et al. 2007. *Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemiareperfusion injury.* Basic Res Cardiol. 2007 Nov;102(6):518-28.

Sörhede Winzell, M. et al. 2005. *The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice.* Regul Pept. 2005 Nov;131(1-3):12-7.

Sorli, SC. et al. *Therapeutic potential of interfering with apelin signalling.* Drug Discov Today. 2006 Dec;11(23-24):1100-6.

Szokodi, I. et al. 2002. *Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility.* Circ Res. 2002 Sep 6;91(5):434-40.

Tatemoto, K. et al. 1998. *Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor.* Biochem Biophys Res Commun. Oct 20;251(2):471-6.

Tatemoto, K. et al. 2001. *The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism.* Regul Pept. 2001 Jun 15;99(2-3):87-92.

Vickers, C. et al. 2002. *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase.* J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):14838-43.

Wang, G. et al. 2004. *Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion.* Endocrinology. 2004 Mar;145(3):1342-8.

Xie, H. et al. 2006. *Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts.* Regul Pept. 2006 May 15;134(2-3):118-25.

Zhou, N. et al. 2004. *The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity.* Virology. 2003 Dec 5;317(1):84-94.

Zou, MX. et al. 2000. *Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV).* FEBS Lett. 2000 May 4;473(1):15-8.

8. APPENDICE 1 : Mesure du calcium intracellulaire dans les myocytes cardiaques en présence d'apéline.

8.1 Matériel et Méthodes

Solutions :

Solution F₁ (en mM) : 1,26 CaCl₂; 5,36 KCl; 0,44 KH₂PO₄; 0,81 MgSO₄; 136,87 NaCl; 0,34 Na₂HPO₄; 5,55 Glucose; 4,17 NaHCO₃; 20 HEPES. pH à 7,4 avec NaOH-HCl.

Solution F₁ supplémentée de Fluo-3 : Solution F₁ avec 3 µM de Fluo-3 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario)

Solution F₂ (en mM) : 115 NaCl; 5 KCl; 10 NaHCO₃; 25 HEPES; 0,5 MgCl₂; 1,2 CaCl₂.

Solution F₃ (en mM) : Solution F₂ contenant 0,1% de BSA.

Solution d'apéline 13 : 100µM d'apéline 13 (Laboratoire de Dr Neugebauer, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec) dissout dans PBS à pH 7,4.

Protocole :

Des pétris contenant des lames de verres couvert la veille de poly-d-lysine (MatTek Corporation, Ashland, MA) furent remplis avec les myocytes isolés provenant du

midmyocarde. Une fois que les cellules furent bien adhérentes au fond du pétri, 1 ml de Solution F₁ suppl  ment  e de Fluo-3 (3  M) fut ajouté. En recouvrant le pétri d'aluminium, les cellules furent mises à la noirceur afin d'éviter la perte de fluorescence de la sonde. Les cellules furent incub  es 30 minutes en présence du fluophore afin de permettre son entrée à l'intérieur des cellules. Par la suite, 2 lavages avec la Solution F₂ furent effectués afin d'éliminer les surplus de sonde. Les cellules furent ensuite incub  es à la noirceur pendant 30 minutes avec la Solution F₃. Pour les enregistrements, la Solution F₃ fut remplac  e par la Solution F₁.

Le pétri fut déposé sur une plaque mobile fix  e au microscope OLYMPUS (Olympus, Markham, Ontario), se déplaçant sur l'axe des X et des Y afin de visualiser les cellules. Des électrodes d'argent furent utilis  es pour stimuler électriquement les cellules. Les stimulations servaient à provoquer des contractions des myocytes et elles furent produites par un stimulateur GRASS S88 (Stimulator Instruments, Quincy, Massachusetts) relié aux électrodes. Les stimulations furent données par le stimulateur à une fréquence de 0,33 Hz, d'une durée de 0,2 X 1000ms et d'une amplitude de 150V. Les niveaux de calcium intracellulaires pendant les contractions furent mesurés. Ainsi, seulement les concentrations de calcium transitoires furent analys  es. Les niveaux de calcium furent mesurés par l'intensité de la fluorescence du complexe Fluo-3-calcium. La fluorescence augmentait lorsqu'elle liait le calcium lors de l'excitation à une longueur d'onde à 506 nm et son émission à une longueur d'ondes de 526 nm fut enregistr  e. Le programme Metafluor (Molecular Devices, Downingtown, PA) fut utilisé pour mesurer l'intensité de la fluorescence à l'aide de la camera CoolSnap (Image Processing Solutions, Inc., North Reading, MA). L'ouverture de la lumière ainsi que le temps d'acquisition fut de 10 ms à

intervalle régulier de 100 ms pendant 30 secondes. Chaque série de 30 secondes fut prise à 5 minutes d'intervalle. La fluorescence fut mesurée dans une petite région délimitée d'une cellule qui contracte. L'apéline 13 à une concentration finale de 100 nM fut déposée directement dans le pétri.

Analyse :

L'intensité de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps fut directement enregistrée dans EXCEL (Microsoft Canada, Mississauga, Ontario). Une série fut définie comme l'ensemble des intensités de fluorescence dans l'intervalle de prise de mesures de 30 secondes. Pour chaque cellule, une série contrôle, une série au temps 0 d'ajout d'apéline 13 et par la suite des séries aux 5 minutes furent prises. Pour chaque série, l'intensité brute (I_b) minimum entre chaque augmentation transitoire fut utilisée pour déterminer la fonction exponentielle de la perte de la fluorescence de la sonde en fonction du temps. Les valeurs furent ensuite mises dans le programme ORIGIN (Originlab Corporation, Northampton, Massachusetts) et un lissage exponentiel fut effectué à partir de l'équation : $I_t = I_0 + Ae^{-t/\tau}$, où I_t représente l'intensité en fonction du temps, I_0 l'intensité maximale et t le temps. Par la suite, la valeur de I_t théorique fut calculée pour tous les temps t . Ces valeurs de I_t théoriques furent par la suite soustraites à toutes les valeurs brutes I_b . Ainsi, seulement les valeurs d'intensité de fluorescence pendant les contractions demeuraient, $I_{\text{transitoire}}$. Par la suite, ces nouvelles valeurs de $I_{\text{transitoire}}$ furent encore une fois transférées dans le programme ORIGIN et l'aire sous la courbe fut calculée. Cette valeur représentait le niveau relatif de calcium intracellulaire dans les myocytes cardiaques durant les contractions cellulaires, donc elle reflétait les

concentrations de calcium intracellulaire transitoire, $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{obtenus}}$. Puisque la fluorescence diminuait en fonction du temps, $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{obtenus}}$ devait être corrigées en fonction des différents niveaux de base entre chaque série. Ainsi, l'intensité basale obtenue à la première prise de mesure (I_{basal}) en contrôle devenait la référence pour les autres séries. La conversion suivante fut donc effectuée : $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{réel}} = [Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{obtenus}} \times I_{\text{basale contrôle}} / I_{\text{basal série donnée}}$, où $I_{\text{basale contrôle}} / I_{\text{basal série donnée}}$ est la rapport entre l'intensité de la fluorescence à la fin de la série contrôle et l'intensité de la fluorescence à la fin d'une série X. Enfin, les résultats furent représentés en pourcentage relatif des niveaux de calcium intracellulaire relativement aux conditions contrôle, $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{relatif}}$.

8.2 Résultats

Ces expériences nous permettaient de vérifier si l'augmentation de la contractilité cardiaque, supportée par d'autres groupes, était liée à une augmentation de calcium intracellulaire causée par une augmentation du courant sodique. Ainsi, des mesures de calcium intracellulaire transitoire en présence d'apéline 13 sur des myocytes du ventricule gauche furent effectuées. Le calcium intracellulaire transitoire $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{relatif}}$ fut ainsi mesuré en condition contrôle et à différents intervalles de temps en présence d'apéline 13 toujours à une concentration de 100 nM.

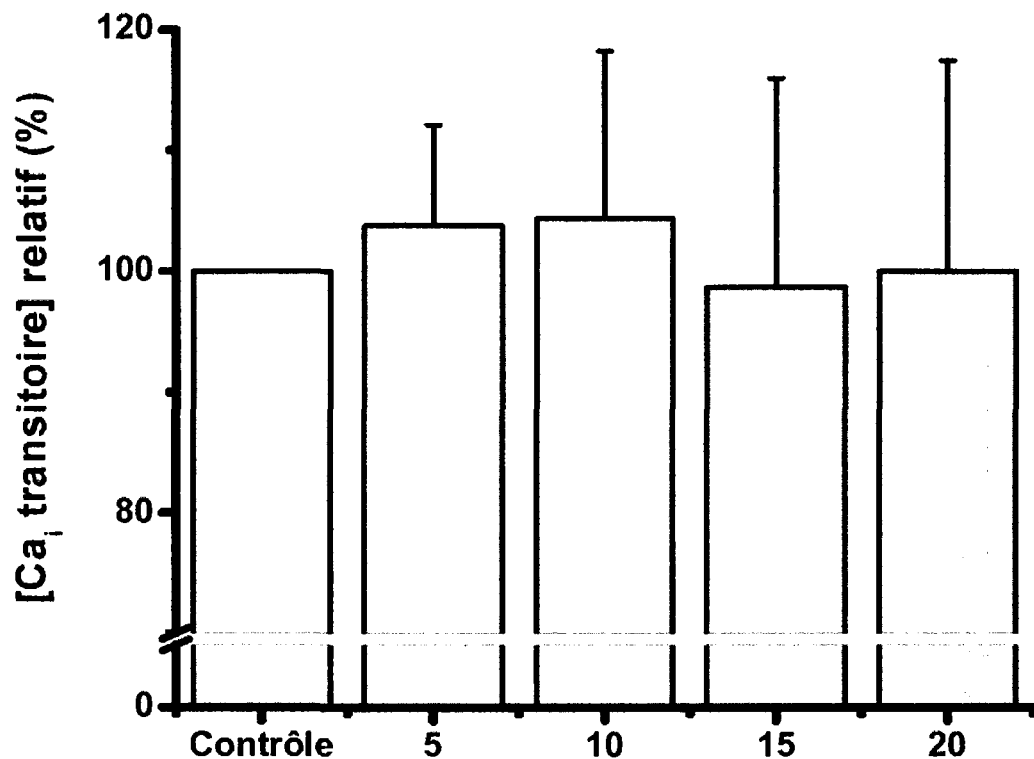


Figure 8.2.1 : Concentration relative de calcium intracellulaire transitoire dans les myocytes cardiaques canins en présence d'apéline 13. Histogramme représentant la $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{relatif}}$ durant les contractions des myocytes en condition contrôle et à différents temps (en minutes) en présence de 100 nM d'apéline 13. Les valeurs sont en pourcentage relatives à la concentration initiale de calcium en condition contrôle mise arbitrairement à 100%. Les valeurs représentent la moyenne des expériences avec le SEM (n=11).

La figure 8.2.1 indique que les $[Ca_i \text{ transitoire}]_{\text{relatif}}$ sont quelque peu augmentés après 5 et 10 minutes d'ajout d'apéline 13. Toutefois, ces valeurs diminuent par la suite avec les temps à 15 et 20 minutes. Comme tous ces changements mineurs ne sont pas significatifs,

l'apéline n'induit pas d'augmentation $[Ca_i]$ transitoire] dans les myocytes de chien. Ainsi, l'augmentation de la force contractile du cœur en présence d'apéline ne semble pas être due à une augmentation de calcium intracellulaire durant les contractions des myocytes.

8.3 Aucune modification des transitoires calciques en présence d'apéline.

Nos résultats démontrent que l'apéline n'induit pas d'augmentation de calcium intracellulaire pendant les contractions des myocytes. Ces résultats semblent en opposition avec notre hypothèse, que l'augmentation du courant sodique entraîne une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Par contre, nos résultats ont pu être affectés par un haut taux de mortalité cellulaire lors de nos expériences et par des conditions des stimulations des cellules cardiaques peut-être non optimales. De plus, étant donnée que la sonde perdait de l'intensité tout au long de l'expérimentation, le calcium basal des myocytes n'a pas pu être mesuré. Il est possible que l'apéline induit une augmentation du calcium intracellulaire tout au long des cycles calciques pendant les contractions et que cette accumulation n'est pas détectée dans les transitoires calciques.

L'absence de l'augmentation du calcium intracellulaire lors des transitoires calciques par l'apéline est déjà démontrée par deux études distinctes. L'étude de Farkasfalvi en 2007 démontrant l'implication de l'échangeur NHE, indique que l'apéline n'induit pas d'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Farkasfalvi et al. 2007). Toutefois, ces mesures ont été effectuées sur un court laps de temps de huit minutes, ce qui n'est pas consistant avec notre augmentation maximale du courant sodique après vingt minutes de perfusion. L'équipe de Dai ont effectué une étude beaucoup plus approfondie

de l'effet de l'apéline sur les niveaux de calcium intracellulaire chez des rats sains et des rats insuffisants cardiaques (Dai et al. 2006). L'apéline n'induit pas d'augmentation significative de calcium intracellulaire durant quinze minutes dans le muscle trabéculaire isolé de rat. Ils ont pu déterminer que l'effet inotrope positif de l'apéline n'était pas dû à un changement d'affinité des filaments d'actine pour le calcium. Cette étude contredit donc les hypothèses de Farkasfalvi qui stipule que l'activité de NHE induit une augmentation de la sensibilité des filaments d'actines pour le calcium. Toutefois, leur étude a été effectuée sur des trabécules, et non directement sur des myocytes du ventricule ou sur un cœur entier. La localisation du récepteur APJ-R dans cette structure n'est pas encore démontrée et il est possible qu'il soit moins exprimé et qu'il ne peut donc agir sur les trabécules.

Par contre, Dai et son équipe démontrent clairement que l'apéline induit une augmentation des transitoires calciques chez des rats insuffisants cardiaques. Ainsi, il est possible que dans un cœur sain, l'effet de l'apéline sur le calcium intracellulaire soit présent, mais non observable par nos techniques de détection. Chez les insuffisants cardiaques, plusieurs modifications protéiques surviennent et l'effet de l'apéline peut donc être plus important. Plusieurs évidences dans la littérature démontrent qu'en insuffisance cardiaque, l'expression protéique et l'activité de l'échangeur NCX sont augmentées comparativement à des cœurs sains (O'Rourke B et al. 1999; Pogwizd SM et al. 1999). Puisque cet échangeur est plus actif en insuffisance cardiaque, il est possible que l'effet de l'augmentation du courant sodique et l'augmentation de la concentration intracellulaire de sodium et subséquemment de calcium par cet échangeur soit seulement observable lorsqu'il est surexprimé. Son effet ne serait donc pas absent chez le cœur sain, mais

indétectable par nos mesures de calcium expérimentales. Même si cet effet semble donc faible au niveau du cœur sain, cela n'implique pas qu'il est insignifiant physiologiquement, puisque l'apéline a bel et bien un effet inotrope positif puissant.

L'effet inotrope positif de l'apéline prédominant chez les insuffisants cardiaques est autant plus intéressant, puisqu'un agoniste du récepteur APJ-R pourrait être un traitement efficace pour cette pathologie. Il pourrait augmenter la force de contraction des ventricules, qui est déficiente chez les patients, et favoriser ainsi une meilleure circulation sanguine. Par contre, tous les patients avec des problèmes de conduction, tel qu'un gain de fonction du canal sodique dans le syndrome du long-QT type 3, seront désavantagés, puisque non seulement ce médicament agirait sur leur force ventriculaire, mais va également augmenter leur problème de conduction par une augmentation encore plus significative du courant sodique causant leur pathologie.